VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

Cell Culture for biochemists

R. L. P. Adams

Department of Biochemistry,
University of Glasgow,
Glasgow G12 8QQ,
Scotland, U. K.

Elsevier/North-Holland
Biomedical Press
Amsterdam New York Oxford

Р. АДАМС

МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ БИОХИМИКОВ

Перевод с английского
канд. биол. наук
М. А. Панова

под редакцией
д-ра биол. наук
В. Ю. Полякова

Москва «Мир» 1983

УДК 578.085.23

В книге английского ученого описываются различные аспекты культивирования клеток: типы клеток млекопитающих, используемые реактивы, оборудование и аппаратура, получение и диспергирование клеток; подробно изложены методы получения клеточных культур из различных тканей, способы культивирования, методы синхронизации клеток, рассмотрены клеточные гибриды и мутанты, взаимоотношения между вирусами и клеточными культурами, дифференцировка клеток в условиях культивирования.

Для цитологов, биохимиков, молекулярных биологов и других специалистов, применяющих методы культуры ткани.

$А \frac{2001040000-320}{041(01)-83}$ 133—83, ч. 1

Редакция литературы по биологии

Роджер Адамс

МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ БИОХИМИКОВ

Ст. научный редактор Л. Г. Тер-Саркисян. Мл. научный редактор З. В. Соллертинская
Художник В. К. Бисенгалиев. Художественный редактор А. В. Лисицын
Технический редактор Н. И. Манохина. Корректор Н. В. Андреева

ИБ № 3301

Сдано в набор 18.11.82. Подписано к печати 02.03.83. Формат 60×90$^1/_{16}$. Объем бум. л. 8,25. Бумага типографская № 2. Гарнитура литерат. Печать высокая. Усл. печ. л. 16,50. Усл. кр.-отт. 16,50. Уч.-изд. л. 17,36. Изд. № 4/2129. Тираж 5.000 экз. Зак. 666.
Цена 2 р. 90 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.

© Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980
© Перевод на русский язык, «Мир», 1983

419137

РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
научная медицинская
библиотека МЗ БССР

Предисловие редактора перевода

Метод тканевых культур чрезвычайно широко используется в современной биологии. Культура ткани особенно удобна для работы в тех случаях, когда задачи исследования требуют синхронной, однородной популяции клеток, кратковременного (импульсного) воздействия ингибиторами различных метаболических путей и т. д. Разумеется, работа с клетками, растущими вне организма, требует определенных навыков, специального оборудования и довольно дорогих реактивов. Попытки максимально стандартизовать метод, сделать его не зависящим от различных субъективных факторов наряду с большим «научным спросом» на культуры клеток привели к созданию соответствующей индустрии, снабжающей исследователей не только посудой и различным специальным оборудованием, но и определенными штаммами клеток. Широкое распространение метода тканевых культур вызывает потребность в издании соответствующих руководств и справочников. В этом смысле книга Адамса может служить хорошим пособием как для начинающих исследователей, так и для опытных специалистов, работающих с культурами тканей.

Основное достоинство книги состоит в том, что, помимо чисто методических рекомендаций и многочисленных прописей, она дает некоторое представление о ряде научных направлений, использующих в качестве основного методического подхода культивирование тканей.

В методической части Адамс делает упор на методики, позволяющие работать с фракциями изолированных клеточных компонентов. Отсюда и название книги «Методы культуры клеток для биохимиков». Естественно, что при таком заведомо ограниченном подходе автору удалось описать лишь малую часть тех методических принципов и научных идей, которые используются в настоящее время при работе с клетками в культуре.

Читатель, желающий получить более подробные сведения о различных аспектах применения культуры ткани, может обратиться к таким руководствам, как «Методы вирусологии и молекулярной биологии» (М: Наука, 1974), книги Перта С. Дж. «Основы культивирования микроорганизмов и тканей» (М: Мир, 1978), Блаттнера Р., Классена Х. и др. «Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц» (М: Мир, 1983) и др.

Анализ перечисленных изданий и тех оригинальных работ, предметом изучения которых служили клетки, культивируемые вне организма, показывает, что возможности культуры ткани в качестве объекта биохимии и молекулярной биологии далеко не исчерпаны. Однако, на мой взгляд, основным преимуществом этого метода остается то, что только в тканевых культурах можно наблюдать *жизнь* клеток, их движение, характер взаимодействия с субстратом, деление и т. д.

В настоящее время разработаны методы микрохирургии живых клеток с помощью манипуляторов или лазерного луча. При этом важно, что «оперированные» клетки можно изучать последовательно в световом и электронном микроскопе, прослеживая судьбу индивидуальных клеток или полученных из них клонов.

Чрезвычайно интересны работы, показывающие формирование «скелета» клетки, изменение свойств клеточной поверхности в ее различных функциональных состояниях. Целый новый и фантастический мир открывается при изучении клеток в сканирующем электронном микроскопе и т. д.

Разумеется, в одной книге, даже такой «емкой» и насыщенной информацией, как монография Адамса, невозможно охватить все направления, по которым развивается метод клеточных культур. Однако появление этой книги безусловно поможет биохимикам и молекулярным биологам в их повседневной работе и облегчит задачу тех, кто решится затронуть другие аспекты этой интересной и перспективной области клеточной биологии.

В. Ю. Поляков

Благодарности

Мне хотелось бы выразить искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории культуры клеток при кафедре биохимии университета Глазго за помощь, которую они охотно оказывают мне в течение многих лет. Мне хочется также поблагодарить отдел медицинских иллюстраций за приведенные в книге иллюстрации и секретарей кафедры биохимии за перепечатывание моей рукописи, написанной местами весьма неразборчиво. Я благодарю и тех, кто разрешил мне использовать принадлежащие им рисунки, а также профессора Smellie за поддержку, которую он оказывал мне в течение многих лет, и доктора John Pitts за помощь при получении нескольких микрофотографий и за предоставление крайне ценной информации для этой книги.

Р. Адамс

Глава 1

Введение

1.1. Основы

В многочисленных изданиях последних лет подробно рассмотрены различные аспекты культивирования клеток (Harris, 1964; Willmer, 1965; Habel, Salzman, 1969; Vago, 1971; Whitaker, 1972; Fogh, 1973; Sato, 1973; Paul, 1975; Kuchler, 1977). Настоящее издание предназначено преимущественно для биохимиков и молекулярных биологов, интересующихся клеточными культурами постольку, поскольку они служат источником материала, необходимого для биохимических исследований.

Прежде чем биохимик решит использовать клеточные культуры, он должен убедиться, что те преимущества, которые он при этом получает, перекроют сопряженные с данным методом трудности. При этом он не должен опасаться, что методы культивирования клеток слишком трудоемки для постоянного использования и что для достижения необходимого успеха ему придется прибегать чуть ли не к черной магии. Эти опасения в известной степени основаны на опыте исследователей, работавших с культурами клеток до 1960 г. За предшествующие тридцать лет удалось культивировать в течение различного времени практически все главные типы клеток, что позволило получить весьма ценную информацию, но это явилось результатом чрезвычайно напряженного труда.

После 1960 г. многие затруднения, встающие на пути биохимиков при использовании этого метода, были устранены в результате трех событий. Наиболее важную роль сыграл, возможно, тот факт, что промышленные компании взяли на себя поставку культуральных сред, сывороток, клеток и посуды для культивирования, что позволило выращивать клетки эпизодически или постоянно на самой различной поверхности — от менее одного квадратного сантиметра до нескольких квадратных метров. Это стало возможным только потому, что, с одной стороны, были созданы простые среды, обеспечивающие хороший рост клеток, а с другой — разработаны простые методы выделения первичных клеток, селекции клонов и хранения клеточных линий.

Одной из очень важных проблем, возникающих при работе с клеточными культурами, является проблема стоимости. В расчете на вес культивируемые клетки оказываются на несколько

порядков дороже, чем, скажем, клетки печени крысы. Так, в частности, от крысы стоимостью меньше 2 фунтов стерлингов можно получить 10 г печени, тогда как 10^6 клеток, получаемых от промышленной фирмы, стоят около 1 фунта, т. е. 10 г таких клеток ($2 \cdot 10^{10}$ клеток) должны стоить 20 000 фунтов. Следует, правда, оговориться, что закупка большой партии клеток сопровождается значительным снижением их цены. Исследователь может получить такое же количество клеток в собственной лаборатории, истратив меньше денег (стоимость среды может составлять всего лишь 15 фунтов), однако при этом упускается из виду общая стоимость исследований. Во всяком случае, прежде чем принимать решение о получении клеточных культур в больших масштабах, следует убедиться, что это дает исследователю значительные преимущества. Использование же культивируемых клеток в качестве исходного материала для очистки фермента редко бывает оправданным, когда доступны такие источники, как печень крысы или почки кролика. С другой стороны, многие эксперименты могут быть поставлены на 10^2—10^6 культивируемых клеток, стоимость которых не превышает альтернативного варианта.

1.2. Некоторые преимущества

Главное преимущество культивируемых клеток, которое полностью используется клеточными биологами, но часто игнорируется биохимиками, — это возможность прижизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа. Существенно то, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течение всего эксперимента. Убедиться в этом можно, периодически тестируя культуру клеток. Более того, легко оценивать относительное содержание жизнеспособных клеток. При опытах же на целом животном состояние почек, например, можно оценить лишь в конце эксперимента, и к тому же обычно лишь качественно.

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях. Более того, исследователь может изменять эти условия в определенных пределах, что позволяет ему оценивать влияние на рост клеток самых различных факторов — pH, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и т. п. Рост может быть оценен в течение короткого периода времени либо по увеличению числа или размера клеток, либо по включению радиоактивных предшественников в клеточную ДНК. Эти реальные преимущества по сравнению с исследованиями на целых

животных ставят клеточные культуры как экспериментальную систему в один ряд с культурами микроорганизмов. Использование клеточных культур позволило в течение нескольких недель проанализировать ростовые потребности клеток человека и подтвердить результаты десятилетних исследований людей, относящихся к генетически различным популяциям, живущих в различных условиях окружающей среды (Eagle, 1955a,b; см. разд. 2.2).

Более того, при работе с культурами клеток существенные результаты могут быть получены при использовании очень небольшого количества клеток. Эксперименты, требующие для выяснения того или иного вопроса использования 100 крыс или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стеклах. Если каждую клетку рассматривать как независимый объект эксперимента, то одна культура на покровном стекле даст более достоверный ответ, чем целая клиника, полная больных. Это является важным преимуществом, когда дело касается человека, и, кроме того, снимает многие этические проблемы, возникающие при необходимости использовать для эксперимента большую группу животных. В ряде случаев на конечных стадиях эксперимента все же возникает необходимость в опытах на целых животных, однако ничто не мешает при этом использовать клеточные культуры в предварительных исследованиях.

Поскольку клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними радиоактивные предшественники, яды, гормоны и т. п. могут быть введены в заданной концентрации и в течение заданного периода времени. Количество этих соединений может быть на порядок меньше, чем при экспериментах на целом животном. Исчезает также опасность того, что исследуемое соединение метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при такой-то концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений. Интерпретация результатов таких экспериментов на целых животных чрезвычайно затруднительна, хотя и в клеточных культурах результаты могут маскироваться повреждающим действием исследуемых соединений (см. гл. 12). Однако в тех случаях, когда цель эксперимента — обнаружить действие того или иного лекарственного препарата или косметического средства на животное, факторы, создающие проблему для одного биохимика, могут явиться сутью эксперимента для другого.

1.3. Применения

Культивирование клеток позволило нам глубоко проникнуть в механизмы роста и дифференцировки клеток. Общие характеристики роста клеточных культур мы рассмотрим в гл. 2. Из последующих глав станет ясно, что, хотя детальные потребности в питательных факторах и механизмы контроля роста весьма сложны, культивируемые клетки в больших или малых количествах могут быть с успехом использованы в настоящее время для проведения биохимических экспериментов.

1.3.1. Дифференцировка

Изучение дифференцировки у высших эукариот представляет собой чрезвычайно сложную проблему, однако мы уже располагаем несколькими системами, способными к дифференцировке in vitro. Некоторые из этих систем будут рассмотрены в гл. 15. Преимущество систем in vitro заключается в том, что после воздействия дифференцировочного стимула популяция клеток претерпевает определенные изменения, которые можно легко выявить и количественно проследить. Такими изменениями могут быть образование белка (например, гемоглобина в случае клеток эритролейкоза Френд — разд. 15.1) или более сложные изменения структуры и характера роста клеток, как это имеет место при дифференцировке и слиянии миобластов (разд. 15.5) или дифференцировке эпидермальных кератиноцитов, образующих систему, напоминающую ороговевающий слой кожи (разд. 15.2).

Большое количество клеточных линий получено из центральной нервной системы — в частности линии дифференцированных клеток глии (Benda et al., 1968; Lightbody et al., 1970; Ponten, 1973) и линии клеток нейронов (Augusti-Tocco, Sato, 1969). Кроме того, Пфайфер и Векслер (Pfeiffer, Wechsler, 1972) выделили линии клеток из опухолей периферической нервной системы (неопластические шванновские клетки). Особенностям культивирования клеток нейрального происхождения посвящена специальная монография (Sato, 1973). Поскольку клетки нейробластомы в культуре могут образовывать отростки, при культивировании этих клеток с дифференцирующимися миобластами происходит образование синапсов, что позволяет изучать передачу синаптических сигналов в весьма простой системе (Schubert et al., 1973). Культивируемые in vitro астроциты и клетки астроцитомы (Guner et al., 1977) легко отличимы от сопутствующих фибробластов по очень длинным отросткам, образующим ретикулярную сеть. В настоящее время предпринимаются попытки выяснить, сохраняют ли эти клетки способность к синтезу и расщеплению нейромедиаторов

(P. T. F. Vaughan, частное сообщение). При культивировании специализированных клеток всегда имеется опасность, что в ходе выделения клеток будут утеряны некоторые характерные свойства клеток. Однако Пфайфер и Векслер (Pfeiffer, Wechsler, 1972) исследовали образование миелина и димиелинизацию в культурах клеток, полученных из опухолей шванновских клеток.

Одна группа опухолевых клеток, плазмацитомы, получена из плазматических клеток, продуцирующих иммуноглобины. Плазмацитомы, способные размножаться in vivo и in vitro, обеспечили значительный успех в изучении механизма образования антител. Эти клетки используются при изучении структуры и функции иммуноглобулинов, и особенно при изучении структуры и образования информационных РНК, что сыграло важную роль в углублении нашего понимания процессинга РНК (Hozumi, Tonegawa, 1976; Weigert et al., 1978) и уникальной перестройки генов для антител, приводящей к разнообразию антител. Эти исследования сыграли важную роль в нашем понимании сложных процессов дифференцировки (разд. 15.4; Rabbitts, Milstein, 1977).

1.3.2. Генетика

Одним из главных преимуществ бактериологов по сравнению с традиционными биохимиками, работающими с эукариотами, являлась доступность широкого набора мутантных микроорганизмов, что позволяло бактериологам проводить сложные генетические эксперименты. Изучение наследственных взаимосвязей у эукариот требовало длительного времени, причем особенно длительным временем генерации отличаются млекопитающие. Наиболее остро эта проблема проявилась при изучении генетики человека, которая в лучшем случае остается лишь описательной наукой. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования (разд. 8.1), хранения (разд. 8.3) и слияния клеток (разд. 13.5), что в свою очередь привело к становлению новой области науки — генетики соматических клеток. Многие из этих исследований концентрировались на изучении активности гена, продукт которого, гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза (ГФРТ), участвует в биосинтезе пуриновых нуклеотидов. Отсутствие этого фермента приводит к развитию злокачественного артрита. Клетки с нарушенным синтезом ГФРТ неспособны к включению аналога гипоксантина, 8-азагуанина и вследствие этого резистентны к токсическому действию аналога. Клеточные биологи использовали такое селективное преимущество ГФРТ⁻-клеток в разви-

тии методов клеточной гибридизации (разд. 13.5) и переноса генов (Goss, Harris, 1975; Willicke et al., 1976a, b).

Изучение потомства в семьях с синдромом Леша — Нихана (Seegmiller et al., 1976) показало, что ген ГФРТ локализован в Х-хромосоме. Это было подтверждено результатами анализа гибридов клеток мышей и человека, утративших большую часть человеческих хромосом (Ricciuti, Ruddle, 1973).

Некоторые группы исследователей, вместо того чтобы надеяться на неупорядоченную потерю хромосом межвидовыми клеточными гибридами, пытались вводить в реципиентные клетки единичные хромосомы либо в составе фосфолипидных липосом (Mukherjee et al., 1978), либо путем обработки диметилсульфоксидом (Miller, Ruddle, 1978). Центральной роли локуса ГФРТ посвящен обзор (Caskey, Kruh, 1979).

1.3.3. Иммунология

Хотя, как указывалось выше, клеточные культуры и находили применение в иммунологии, в течение ряда лет использование этой системы осложнялось следующим обстоятельством. Клетки, синтезирующие интересующие исследователей антитела (например, клетки селезенки животных, иммунизированных специфическими антигенами), плохо росли в культуре или совсем не росли, а клетки миеломы продуцировали антитела с неизвестной специфичностью (разд. 15.4). Способность этих двух типов клеток к слиянию позволила в последнее время наладить крупномасштабное производство моноклональных антител (Kohler, Milstein, 1975). Если мышь иммунизировать неочищенным препаратом антигена и затем клетки ее селезенки гибридизовать с клетками миеломы, то среди полученных гибридных клеток найдется по крайней мере одна, продуцирующая антитела, специфические к исходному антигену. Эта клетка может быть клонирована (разд. 8.1) и трансплантирована в мышь в форме опухоли, продуцирующей высокоспецифические антитела в количестве, измеряемом граммами. Представляя безусловный интерес для иммунологов, это, кроме того, дает возможность биохимику получать антитела к материалу, который он не может должным образом очистить. Такие антитела могут быть, в частности, использованы для генетического анализа антигенов поверхности клеток человека (Barnstable et al., 1978).

1.3.4. Гормоны

Шестая конференция в Колд-Спринг-Харборе по клеточной пролиферации (август — сентябрь 1978 г.) была посвящена проблемам, связанным с гормонами и культурами клеток (Rudland, 1978). Программа конференции была разделена на две части. Первая часть была посвящена изучению факторов, стимули-

рующих рост (эти вопросы будут более подробно рассмотрены в разд. 2.2 и 7.7). Вторая часть была посвящена изучению действия гормонов на пролиферацию клеток. В основе такого разделения лежит работа Гьюнера и др. (Guner et al., 1977), которые пытались выяснить причину благоприятного действия инъекций глюкокортикоидных стероидов больным с опухолями мозга. Они показали, что дексаметазон в низких концентрациях увеличивает эффективность клонирования клеток астроцитомы человека, что может быть обусловлено появлением поверхностного клеточного антигена, аналогичного обнаруженному Баллардом и Томкинсом (Ballard, Tomkins, 1969) при обработке дексаметазоном культуры клеток гепатомы (НТС). Однако культуры клеток астроцитомы достигают более низкой конечной плотности, и, следовательно, в плотной культуре в присутствии дексаметазона меньшее количество клеток синтезирует ДНК (Freshney, 1979), что может служить основанием для использования глюкокортикоидов в терапии. Кроме того, глюкокортикоиды захватываются неопластическими лимфоидными клетками в культуре и вызывают гибель этих клеток. К настоящему времени получены мутанты, позволяющие исследовать гены глюкокортикоидных рецепторов (Bourgeois, Newby, 1977).

Применение культур биопсий опухолей молочной железы человека для предсказания эффективности гормонотерапии этих опухолей в настоящее время только начинается (Leake, 1978). Однако уже получена линия клеток рака молочной железы человека (Lippman et al., 1977), в которых в ответ на обработку эстрогенами увеличивается потребление аминокислот и нуклеозидов (линия MCF-7). В этих исследованиях важно проводить обработку гормонами в отсутствие вмешивающихся в действие гормонов факторов сыворотки; однако использование системы in vitro позволяет сравнивать активность различных эстрогенов с их сродством к рецепторному белку.

Биохимический механизм овуляции дает основание думать, что за разрушение граафовых пузырьков ответствен активатор (сериновая протеаза); этот процесс сейчас исследуется in vitro путем обработки культур зернистого слоя яичников фолликулостимулирующим или лютеинизирующим гормонами (Strickland, Beers, 1976).

1.3.5. Образование клеточных продуктов

Культуры клеток могут стать ценным источником гормонов и других секретируемых материалов, если будут предприняты дальнейшие попытки оптимизации системы в этом направлении. Культуры клеток уже сейчас оказываются важными продуцентами видоспецифического противовирусного агента интерферона. Предложен метод выделения интерферона из куль-

туральной среды мышиных L-клеток, обработанных инактивированным вирусом или невирусным индуктором poly (I : C) (Ogburn et al., 1973).

Интерферон продуцируется зараженными вирусами клетками и индуцирует в других клетках антивирусное состояние, объясняющееся, по крайней мере частично, подавлением трансляции вирусной мРНК (Revel, Guner, 1978). Интерферон обладает клеточной специфичностью, и, следовательно, для получения человеческого интерферона следует использовать культуру клеток человека. Для получения интерферона используются фибробласты и лейкоциты; в число индуцирующих вирусов входят вирус Сендай и вирус ньюкаслской болезни (Gresser, 1961; Baron, Isaacs, 1962; Merigan et al., 1966). Кроме того, для тестирования интерферона должны использоваться культуры гомологичных клеток. Для тестирования человеческого интерферона используются культуры первичных поздних эмбриональных фибробластов или фибробластов крайней плоти (Merigan et al., 1966). Линия диплоидных клеток W138 оказывается менее чувствительной.

Тестирование интерферона включает в себя инкубацию клеток в течение ночи при возрастающих разведениях интерферона с последующим заражением их каким-либо вирусом, например вирусом везикулярного стоматита (ВВС) при множественности заражения 20 БОЕ на клетку. Через 20 ч после заражения собирают культуральную среду и определяют в ней содержание ВВС с помощью метода бляшек в культуре мышиных клеток (разд. 14.3.2). Наибольшее разведение интерферона, подавляющее выход вируса в 3,2 раза (0,5 lg), содержит 1 ед. интерферона (Baron, 1969).

Наиболее подходящей системой для сбора метаболитов, секретируемых клетками в культуральную среду, является культивирование клеток на капиллярной подложке (разд. 3.2.3.4). В ряде работ имеются сообщения о выделении хорионического гонадотропина из перфузата такой культуры клеток хориокарциномы человека (Odell et al., 1967; Knazek, Gullino, 1973; Knazek et al., 1974). Эритропоэтин присутствует в сыворотке и в моче в очень низкой концентрации, так что идея использования клеточных культур для получения больших количеств эритропоэтина кажется заманчивой. Однако попытки получения эритропоэтина в культуре имели до настоящего времени лишь ограниченный успех. Возможные причины этих неудач рассмотрены в недавно опубликованном обзоре (Ogle et al., 1978).

1.3.6. Вирусология и трансформация клеток

Тот прогресс в области вирусологии, который произошел в последнее десятилетие, в значительной степени обусловлен возможностью выращивать вирусы в культурах клеток. Дело не

только в том, что при этом для получения вирусов не требуется большого количества животных. Дело также и в том, что благодаря этому методу прежние трудоемкие и плохо воспроизводимые тесты были заменены такими простыми, точными и воспроизводимыми методами детектирования вирусов, как методы бляшек, получения вирусов и окрашивания (гл. 14). В результате применения этих методов выяснилось, что вирусы способны не только инфицировать и убивать клетки, но могут также вызывать изменения в характере роста клеток — феномен, известный как вирусная трансформация клеток (разд. 2.1 и 14.4). Эти изменения, приводящие к появлению клеток, не реагирующих на своих соседей так, как это характерно для нетрансформированных клеток, вызывают особый интерес в связи с тем, что они могут помочь нам понять природу трансформации, поскольку сходные изменения, происходящие с клетками in vitro, играют, очевидно, какую-то роль в индукции опухолей (разд. 14.4).

Поскольку в настоящее время большая часть вирусных заболеваний лечится путем введения антисыворотки, выращивание вирусов имеет важное значение как для идентификации вирусов (разд. 14.3), так и для их использования в получении вакцин. Эти задачи решаются большей частью с использованием клеточных культур, и многие вирологические отделения клиник обеспечены оборудованием для выращивания клеток и получения вирусов в больших количествах.

1.3.7. Определение цитотоксичности

Главным направлением использования клеточных культур представляется тестирование и изучение механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов и т. п. Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя, безусловно, экстраполировать на целые организмы, но не вызывает сомнения, что если то или иное вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному. Помимо того, что использование культур клеток избавляет от страданий большое количество животных, использование культур клеток человека позволяет оценивать повреждающее действие веществ у вида, недоступного для экспериментов такого рода, т. е. у человека. Более того, как уже упоминалось выше (разд. 1.2), результаты тестов оказываются более воспроизводимыми, когда они проводятся in vitro.

Несколько другой тип определения цитотоксичности представляет собой скрининг препаратов лимфоцитов на противо-

опухолевую активность. В 1967 г. был предложен тест (Hellström, 1967), согласно которому животных иммунизировали опухолевыми клетками и определяли способность их лимфоцитов подавлять рост исходных опухолевых клеток, использованных для иммунизации. Такое микроопределение токсичности может быть проведено в объемах от 10 мкл до 5 мл и выше. Обычно этот тест проводится в лунках по 0,3 мл на пластинках для микротитрования (табл. 3.1; Hellström, Hellström, 1971).

Оценку цитотоксичности можно производить путем подсчета жизнеспособных клеток (разд. 8.2.4), но при большом числе проб этот метод утомителен, поскольку требует многих часов наблюдения клеток в микроскопе. Более простой метод, который недавно был автоматизирован благодаря введению коллектора надосадочной жидкости Titertek (см. приложение 3), основан на определении радиоактивного хрома, выделяемого клетками в среду при гибели. Коллектор надосадочной жидкости состоит из абсорбирующих цилиндров, расположенных таким образом, что они могут вставляться в лунки пластинки для микротитрования Titertek/Linbro (см. приложение 3). После того как надосадочная жидкость из лунок абсорбируется цилиндрами, их переносят в счетные флаконы и определяют количество радиоактивного хрома, выделяемого клеточным монослоем.

Клетки быстро захватывают меченный ^{51}Cr хромат натрия, а его избыток легко удаляется ополаскиванием клеточного монослоя культуральной средой. Для мечения клеток достаточно всего лишь 30 мин, и при последующей гибели клеток более 75% радиоактивности высвобождается в надосадочную жидкость (Wigzell, 1965; Hirschberg et al., 1977).

Коллектор надосадочной жидкости, предназначенный для определения высвобождения ^{51}Cr, может быть использован биохимиками и для других целей.

1.4. Культура растительной ткани

Эта проблема заслуживает специального рассмотрения, и читателю следует обратиться ко второму изданию книги «Plant Tissue and Cell Culture» (Street, 1977). Хотя культивирование растительных клеток основано на тех же принципах, что и культивирование животных клеток, методология культивирования в двух этих случаях несколько различается. В известной степени это обусловлено историческими причинами, но определенную роль играют также и различия в особенностях роста растительных клеток, растущих в культуре. Так, клетки моркови или табака могут расти в виде каллюса, в виде суспензии или же в их культуре может быть индуцирован эмбриогенез (Street, 1975a) или органогенез (Street, 1975b).

Для получения культур каллюса используются побеги или стебли. Побеги для этой цели получают из стерилизованных семян, проращиваемых в асептических условиях (Street, 1975a). При использовании же стеблей их стерилизуют и расщепляют в асептических условиях так, чтобы их сердцевина была доступна для питательной среды.

В качестве сред для культивирования обычно используют модификации предложенной ранее среды (Murashige, Skoog, 1962), к которой добавляют растительные гормоны роста, 3-индолилуксусную кислоту и кинетин, или их аналоги (Dalton, Street, 1976). Однако среды, используемые в повседневной практике, значительно различаются между собой (Heller, 1953; Nitsch, Nitsch, 1956).

Культуры каллюса начинают свой рост из растительной ткани, и такой тип культуры используется для поддержания материала. Культуры каллюса обычно поддерживаются на поверхности твердой агаровой среды. По этой причине различные участки каллюса оказываются в различных условиях окружающей среды; поэтому в большинстве случаев для биохимических исследований используются диспергированные клетки каллюса, растущие в суспензии. При возвращении на твердую среду клетки претерпевают определенную последовательность клеточных делений, приводящих к появлению адвентивных эмбрионов (Reinert et al., 1977).

В последнее время культура растительной ткани приобрела большое значение для сельскохозяйственной промышленности. Произошло это, когда было показано, что из одной клетки, отделенной от каллюса, может быть выращено индивидуальное растение моркови, т. е. тысячи идентичных растений моркови могут быть получены из одного кусочка каллюсной ткани. Следовательно, при получении растения с повышенной продуктивностью нет необходимости ждать несколько лет для его воспроизводства и накопления достаточного количества посевного материала. Вместо этого в течение нескольких месяцев можно получить много идентичных клонированных растений. Все эти растения будут одинаковы по внешнему виду, цвету и размеру с редкими случаями неконтролируемых вариаций. Фирма Gibco and Gibco Biocult (см. приложение 3) производит различные серии сред и добавок к средам для культур растительных тканей и поставляет их работникам сельского хозяйства Объединенного королевства и Соединенных Штатов Америки.

Глава 2

Характерные особенности культивируемых клеток

2.1. *Первичные клетки и трансформация*

Клетки, полученные от животного и поддерживаемые в культуре, называют *первичными клетками* до тех пор, пока они не будут субкультивированы (гл. 5). При успешном установлении культуры первичные клетки начинают размножаться, и их необходимо периодически пересевать (субкультивировать).

При достижении полного монослоя первичную культуру следует пересеять в 2 или 4 новых флакона, причем рассев культуры может повторяться примерно с недельным интервалом в течение нескольких месяцев. Клетки могут при этом оставаться диплоидными и сохранять многие характерные особенности исходного эксплантата. Такую культуру называют *клеточной линией*. В ней может присутствовать несколько различных сортов клеток, и некоторые характерные особенности клеток могут оказаться нестабильными. Клетки можно клонировать (гл. 8), причем некоторые клоны могут обладать стабильным фенотипом. К таким клонам относится штамм эмбриональных легочных клеток человека, WI38, который продается в замороженном состоянии после нескольких пассажей.

Ранее исследователи полагали, что при поддержании соматических клеток в культуре в подходящих условиях клетки могут делиться в течение неограниченно долгого времени, сохраняя немодифицированную форму. Однако дальнейшие исследования показали, что это не так. Культуры первичных клеток легко получить из многих тканей. Какое-то время эти клетки эскпоненциально размножаются, но затем примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается, а через 10 месяцев клетки дегенерируют и погибают. Это наблюдается после ~50 генераций, когда из каждой начальной первичной клетки образуется культура примерно из 10^{22} клеток (Hayflick, Moorhead, 1961). (Следует, однако, иметь в виду, что 50 генераций характерны для первичных культур, полученных из эмбриональных тканей, а клетки, полученные из тканей взрослого организма, переживают около 20 генераций при культивировании in vitro.) На ранних стадиях клетки остаются эуплоидными, т. е. обладают правильным диплоидным набором хромосом, а позднее они становятся анеуплоидными. В редких случаях некоторые из этих анеуплоидных клеток выживают и продолжа-

ют размножаться, что приводит к установлению *клеточного штамма*. Частоту таких трансформаций можно увеличить, обработав первичные клетки мутагенами или некоторыми вирусами (гл. 14). Так, например, обработка метилхолантреном привела к получению штамма мышиных L-клеток (Earle, 1943), из которых позднее были клонированы клетки L929. Хромосомный набор трансформированных клеток выраженно анеуплоидный и вариабельный. Так, набор хромосом в клетках L929 варьирует в пределах от 56 до 241 с модальным значением 66. При этом клетки L929 настолько меняют свою морфологию, что ничем не напоминают фибробластов, из которых в свое время были получены.

Клеточные штаммы обладают специфическими свойствами, которые сохраняются в течение длительного культивирования. Многие стабильные клеточные штаммы способны к неопределенно длительному росту и размножению в культуре, причем, как правило, это связано с анеуплоидным кариотипом. Некоторые штаммы клеток, например фибробласты хомячка ВНК21 (Macpherson, Stoker, 1962; Stoker, Macpherson, 1964), обладают правильным диплоидным числом хромосом, но их кариотип, по-видимому, изменен. Эти клетки лишь минимально трансформированы, поскольку они в определенной степени сохраняют чувствительность к контактному торможению (см. разд. 2.3.3) и могут быть далее трансформированы вирусом полиомы (с образованием PyY-клеток) или вирусом SV40 (с образованием клеток SV28) (гл. 14).

Другие штаммы клеток, например клетки HeLa (Gey, 1955), которые исходно получены из опухолевых тканей, возникают, по-видимому, в результате трансформации in vivo. И хотя не все популяции неопластических клеток способны к неограниченному росту in vitro, многие широко используемые штаммы клеток человека имеют именно эту природу (например, штаммы НЕР2, КВ, детройт 6).

Следует учитывать, что возможна и иная причина появления в первичных культурах быстрорастущих «трансформированных» клеток, отличающихся по морфологии и кариотипу. Культуры первичных клеток могут быть «заражены» клетками других линий, которые ведутся в этой же лаборатории. Так случилось в лаборатории Паркера, когда клетки L929 случайно попали в несколько первичных культур и впоследствии вытеснили первичные клетки. Это событие было подтверждено только после тщательного кариотипического анализа и проведения тестов на трансплантационную специфичность (Parker, 1959). Частое повторение таких случаев привело к ужесточению правил работы с клетками, но случаи «взаимозагрязнения» клеточных культур все же имеют место, особенно в таких исследовательских лабораториях (и даже в лабораториях ком-

мерческих фирм), в которых постоянно пассируется много клеточных линий. Так, было показано (Lavappa, 1978), что 21 клеточная линия из Американской коллекции типовых культур (АТСС) являются производными клеток HeLa. В настоящее время идентификация штаммов проводится с помощью стандартных иммунологических тестов и тестов на чувствительность к вирусам.

В литературе не имеется твердой точки зрения на употребление терминов «линия клеток» и «штамм клеток», в связи с чем многие авторы рассматривают их как взаимозаменяемые. Другие же исследователи определяют штамм клеток как популяцию клеток, полученную из первичной культуры путем пересева, а под линией клеток понимают клеточную популяцию, полученную из первичной культуры и выращиваемую неопределенно долгое время in vitro (Hayflick, Moorhead, 1961).

Соотношение между количеством генераций и количеством пассажей зависит от *отношения пассирования*. Если клетки пассируются таким образом, что содержимое одного флакона распределяется между двумя новыми флаконами (отношение пассирования 1 : 2), то количество пассажей и количество генераций оказываются одним и тем же. В этом случае образование полного монослоя и необходимость пассирования достигаются после удвоения числа клеток в культуре. При отношении пассирования 1 : 4 возраст клеток, выраженный в количестве генераций, будет вдвое выше, чем количество пассажей.

2.2. Потребности в питательных веществах

В 40-х и начале 50-х годов большая часть клеток выращивалась в плазме или на фибриногеновом сгустке в присутствии тканевых экстрактов или их ультрафильтратов. Две клеточные линии, мышиные L-клетки (Sanford et al., 1948) и клетки HeLa (Gey, 1955) выращивались на внутренней поверхности стеклянных контейнеров. В своей классической работе Игл (Eagle, 1955a, b) исследовал потребности этих клеточных линий в питательных веществах. Ему удалось добиться размножения клеток этих штаммов в среде определенного состава, содержащей смесь аминокислот, витаминов, солей и углеводов, а также небольшое количество диализованной сыворотки лошади или человека. Специфическая питательная недостаточность индуцировалась удалением из среды какой-либо аминокислоты или витаминов, причем последствия этого удаления должны были быть скомпенсированы при восстановлении недостающего компонента. 27 факторов были определены как незаменимые для роста. Они составили основу среды, известной как «базальная среда Игла», или БСИ. Из 20 аминокислот 13 оказались незаменимыми, а остальные 6 могли быть синтезированы клетками

из других источников углерода. Удаление любого из семи витаминов приводило к развитию симптомов недостаточности. Таким образом, Игл, используя метод культивирования клеток, продемонстрировал питательные потребности клеток мыши и человека. При культивировании клеток в БСИ среду необходимо обновлять, и поэтому БСИ была вскоре заменена на минимальную среду Игла (МСИ) (гл. 7 и приложение 1), в которой концентрация различных компонентов была повышена, что обеспечивало непрерывный рост клеток в культуре в течение нескольких суток без смены среды.

Сыворотка служит источником неидентифицированных факторов в среде Игла. До сих пор нет общего мнения относительно роли сыворотки в клеточных культурах. Неизвестно, является ли сыворотка источником низкомолекулярных соединений, требующихся в очень малых количествах и переносимых сывороточными белками, или же сыворотка обеспечивает клетки незаменимыми белками, или же, наконец, сыворотка служит источником и низкомолекулярных и высокомолекулярных незаменимых соединений. Было показано (Lieberman, Ove, 1957; Fisher et al., 1958), что α-глобулиновая фракция (фетуин), присутствующая как в сыворотке плода, так и в сыворотке взрослого организма, способствует прикреплению клеток к стеклу и их распластыванию, т. е. обоим процессам, необходимым для размножения клеток. Действие фетуина приписывают его антитриптической активности (Fisher et al., 1958). В настоящее время после трипсинизации ткани (гл. 6) или клеточного монослоя (гл. 5) действие трипсина обычно блокируют добавлением среды, содержащей сыворотку.

В 70-х годах исследователей заинтересовала роль сывороточного альбумина в культурах в связи со способностью этого белка служить переносчиком для небольших молекул. Эти небольшие молекулы (гормоны) могут стимулировать in vivo и in vitro рост различных типов клеток. Более подробно эта проблема будет рассмотрена в разд. 7.7.

Одна из проблем, возникающих при попытках получать культуры одиночных клеток или культуры клеток с низкой плотностью (например, 100 клеток в 1 мл), заключается в том, что в этих условиях клетки погибают или растут очень медленно. Клетки могут расти при низкой плотности, если помимо обычных компонентов добавлять в среду серин (Lockart, Eagle, 1959), или цистин (Eagle et al., 1961). В результате подробного изучения этих и других потребностей, зависящих от плотности популяции (Eagle, Piez, 1962), была разработана концепция «кондиционированной среды». Клетки способны синтезировать различные добавочные компоненты, однако они выходят из клеток в среду со скоростью, превышающей биосинтетическую способность клеток. Кондиционированная среда — это такая

среда, в которой концентрация метаболитов находится на таком уровне, что наступает равновесие между выходом метаболитов из клеток в среду и обратным захватом этих метаболитов клетками.

2.3. Контроль роста

2.3.1. Клеточный цикл и цикл роста

Растущие клетки регулярно делятся примерно один раз в каждые 24 часа. В период между делениями, т. е. в интерфазе, клетки удваивают количество ДНК в течение определенной фазы клеточного цикла, так называемой фазы синтеза ДНК или фазы S. Фаза S отделена от клеточного деления или митоза двумя периодами G1 и G2 (см. рис. 10.1). При отсутствии каких-либо ограничений клетки равномерно распределены по клеточному циклу, и если количество клеток удваивается через правильные промежутки времени, то говорят, что культура находится на стадии экспоненциального роста.

Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим. Это может происходить в результате истощения какого-либо фактора среды или же в результате того, что культивируемые клетки полностью покроют поверхность, на которой они растут (см. разд. 2.3.3). Скорость роста культуры при этом замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения (конечная плотность клеток). Когда дальнейшие деления клеток прекращаются, наступает стационарная фаза роста культуры. При восстановлении в культуре лимитирующего фактора клетки возвращаются в фазу G1 клеточного цикла, происходит цикл синтеза ДНК, после чего клетка делится. Имеется несколько теорий, объясняющих такой тип контроля роста (разд. 10.4), но все они исходят из предположения, что контроль осуществляется на каком-то этапе, расположенном вскоре после деления. После прохождения этого этапа клетки включаются в клеточный цикл и делятся.

Большая часть клеток у животных находится под такой формой контроля роста, что они прекращают продвижение по клеточному циклу, вскоре после митоза. Следовательно, для стимуляции первичной клеточной культуры, прежде чем клетки возобновят движение по циклу к фазе деления, следует устранить ограничение роста. Клетки некоторых быстро растущих опухолей утрачивают чувствительность к контролю роста, и поэтому полученные из опухолей первичные клетки легко адаптируются к росту в культуре и могут дорастать до более высокой плотности по сравнению с клетками из нормальных тканей (см. ниже).

В культурах иногда образуются гигантские клетки — особенно в случаях роста в неоптимальных условиях. Образование таких клеток обусловлено тем, что растущие клетки теряют способность делиться и могут увеличиваться в размере, пока не достигнут в диаметре 1 мм и более. Частота образования гигантских клеток заметно увеличивается в результате облучения (Tolmach, Marcus, 1960). Наличие небольшого количества гигантских клеток в популяции, вероятно, не представляет особенных проблем для биохимических исследований, но если их число растет, то это отражает плохие условия культивирования; такие культуры должны быть выбракованы и заменены новыми культурами, растущими в нормальной среде.

2.3.2. Зависимость от прикрепления и рост в суспензии

Хотя лимфоциты не обнаруживают тенденции к агрегации in vivo и могут расти in vitro в суспензии (разд. 6.3), большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти in vivo и in vitro только будучи прикрепленными к субстрату — либо к другим клеткам, либо к коллагену, либо к стеклу или пластику (Klebe, 1974). Пластиковая поверхность должна быть специально обработана, чтобы клетки могли к ней прикрепиться, причем клетки эукариот не прикрепляются к пластиковым чашкам, предназначенным для бактериальных культур. При закупке пластиковой посуды важно выяснить, что она предназначена для культуры тканевых клеток; в каталогах такая посуда обычно обозначается буквами TC (tissue culture). К природным субстратам, на которых фибробласты растут in vivo, относится коллаген. Клиб (Klebe, 1974) описал приготовление чашек, покрытых коллагеном. Другим излюбленным субстратом для изучения закономерностей роста клеток в зависимости от прикрепления к субстрату является желатин (денатурированный коллаген). Чашки могут быть обработаны водным раствором желатина (1% в течение 2 ч при 4 °C), после чего их следует ополоснуть водой и хранить при комнатной температуре вплоть до употребления.

Для некоторых целей рост клеток, прикрепленных к субстрату, оказывается предпочтительнее, но для других целей лучше использовать клеточные суспензии. Как правило, клетки, отделившиеся от субстрата, на котором они росли, неспособны к росту в суспензии и быстро дегенерируют. Было показано (Earle et al., 1954), что если L-клетки поддерживать во вращающемся флаконе при скорости его вращения 40 об/мин, то такие клетки не прикрепляются к поверхности, а добавление в культуру метилцеллюлозы (Methocel) до концентрации 0,1% предотвращает агрегацию клеток и поддерживает их жизне-

способность. Был отобран ряд клеточных штаммов (таких, как HeLa S3 и LS), хорошо растущих в суспензии, но некоторые другие штаммы клеток, такие, как А9, могут расти как на субстрате, так и в суспензии в зависимости от солевого состава культуральной среды; удаление двухвалентных ионов и увеличение концентрации фосфата благоприятствуют росту клеток в суспензии (см. разд. 7.2 и Eagle, 1959).

2.3.3. Регуляция, зависящая от плотности культуры (контактное торможение)

Первичные клетки, которые делятся в культуре, могут претерпевать так называемое контактное торможение движения (Abercrombie, Heaysman, 1954). Когда две клетки приближаются друг к другу, то в зоне контакта прекращаются специфические движения клеточной мембраны. Первичные клетки, следовательно, не могут расти друг над другом, и в большинстве случаев достижение плотного монослоя сопровождается прекращением клеточных делений. Этот феномен характерен не только для первичных клеток, но наблюдается также во многих клеточных линиях. Прекрасным примером этому служит линия мышиных фибробластов 3Т3. Клетки этой линии быстро размножаются в редкой культуре, но как только клетки образуют полный монослой ($\sim 10^6$ клеток на чашку диаметром 6 см), все деления полностью прекращаются (Holley, Kiernan, 1968). Эти нетрансформированные клетки могут в течение некоторого времени полностью сохранять жизнеспособность в таком покоящемся состоянии. Конечная плотность клеток зависит от концентрации сыворотки в среде. Было показано (Todaro et al., 1965), что добавление сыворотки к контактно-заторможенной культуре индуцирует цикл синтеза ДНК и клеточных делений. Из сыворотки было выделено несколько факторов, обладающих способностью снимать контактное торможение (Holley, Kiernan, 1968; Holley, 1975). Ослабленным контактным торможением характеризуются также клетки, трансформированные вирусами (разд. 13.4) (Holley, Kiernan, 1968; Dulbecco, 1970), так что такие клетки могут достигать более высокой конечной плотности. Считается, что эти клетки утрачивают зависящую от плотности регуляцию. Трансформированные клетки в отличие от нетрансформированных продолжают расти вплоть до истощения среды, и если после этого не сменить среды, то клетки быстро погибают. Создается впечатление, что рост трансформированных клеток менее зависим от таких макромолекулярных компонентов сыворотки, как гормоны и факторы роста (разд. 7.7), и ограничивается только при истощении в среде низкомолекулярных компонентов.

По мере роста клеточного монослоя происходят следующие изменения: 1) клетки становятся более скученными и менее распластанными, что приводит к уменьшению доли клеточной поверхности, обращенной к среде; 2) среда истощается по питательным и другим компонентам, особенно в зоне, непосредственно примыкающей к клеткам (Stoker, 1973).

Если из полного монослоя нетрансформированных клеток (например, мышиных эмбриональных клеток 3T3) удалить часть пласта, то в клетках, примыкающих к краю такой «раны», происходит стимуляция синтеза ДНК и делений. В результате клетки быстро занимают поверхность «раны» в монослое. Это явление, известное под названием *топоингибирования* (Dulbecco, 1970), объясняется в настоящее время увеличением обращенной к среде поверхности у клеток, находящихся на краю «раны», вызванном удалением соседних клеток (Stoker, 1973; Dulbecco, Elkington, 1973).

Снижение распластывания клеток при достижении полного монослоя, а также ошаривание и прекращение роста клеток при их откреплении от подложки легли в основу представлений о тесной связи степени распластывания нетрансформированных клеток с их ростом (Folkman, Moscona, 1978). Остается неясным, контролируют ли клетки скорость захвата питательных веществ и собственный рост путем активного контроля своей формы.

Как было показано (Walther et al., 1976), межклеточная адгезия происходит в три этапа.

1. Начальное соединение клеток, не требующее энергии.
2. Спустя 2 мин при 27 °С между клетками образуется связь, разрушающаяся 0,01%-ным трипсином. Эта связь образуется только между клетками, но не между клетками и субстратом.
3. Спустя 8 мин при 37 °С образуется более стабильная связь.

Однако, за исключением случаев щелевых контактов (gap junction, см. разд. 13.6), расстояние между клетками и между клетками и субстратом оказывается не меньше 45 нм (Klebe, 1974).

2.3.4. *Клеточная мембрана*

Клеточная мембрана представляет собой жидкий, частично отрицательно заряженный двойной слой. Отрицательно заряженные гликопротеиды располагаются на наружной поверхности клеточной мембраны, но их полипептидные цепи проникают через клеточную мембрану и контактируют с внутриклеточными белками. Именно эти поверхностные гликопротеиды и играют ведущую роль в межклеточном узнавании и клеточной адгезии. Еще в 1962 г. было высказано предположение о том, что гли-

копротеиды клеточной поверхности могут играть важную роль в контактном торможении (Abercrombie, Ambrose, 1962; см. разд. 2.3.2). В дальнейшем было показано, что насыщающая плотность клеток в культуре тесно коррелирует с опухолеродностью этих клеток при имплантации мышам (Aaronson, Todaro, 1968); иными словами, существует тесная корреляция между гликопротеидами клеточной поверхности и феноменом клеточной трансформации. Было показано, что гликопротеиды клеточной поверхности могут маскировать участки агглютинации, узнаваемые на клеточной мембране растительными лектинами, такими, как фитогемагглютинин и конканавалин, и тем самым препятствовать агрегации нетрансформированных клеток этими лектинами (Aub et al., 1963). Эти участки агглютинации доступны для лектинов на поверхности опухолевых клеток и могут стать частично доступными на поверхности нетрансформированных клеток в результате обработки последних 0,005%-ной проназой или 0,007%-ным трипсином. Такая обработка приводит к частичной потере контактного торможения и индуцирует цикл деления, как это было показано, в полном монослое клеток 3T3 (Burger, 1970).

Гликопротеиды клеточной поверхности могут также маскировать антигены гистосовместимости H-2 и влиять тем самым на способность асцитных клеток к трансплантации (Sandcord et al., 1973).

Главным гликопротеидом клеточной поверхности является фибронектин (Yamada, Olden, 1978; Olden et al., 1979). Этот белок известен также под названиями cig (от англ. cold insoluble globulin — нерастворимый на холоду глобулин), CSP (от англ. cell surface protein — клеточный поверхностный белок), α2-SB (от англ. surface binding glucoprotein — поверхностный связывающий гликопротеид) и белок LETS (от англ. large, external, transformation-sensitive — большой, внешний, чувствительный к трансформации белок). Фибронектин характеризуется молекулярной массой 220 000, но может существовать также в форме связанных дисульфидными связями димеров и более высоких олигомеров; этот белок обнаруживается в сыворотке и на поверхности нормальных, но не трансформированных клеток. Он может быть удален с клеточной поверхности очень низкими концентрациями трипсина (Pearlstein, 1976). Фибронектин отсутствует на поверхности митотических клеток, и его количество резко увеличивается при достижении нормальными клетками полного монослоя, или при остановке клеточной пролиферации при низкой концентрации сыворотки (Pearlstein, 1976; Hynes, Bye, 1974).

Добавление фибронектина к трансформированным клеткам приводит к частичной нормализации клеточного фенотипа, что выражается в увеличении адгезии клеток друг к другу и к

субстрату. По-видимому, фибронектин является одним из факторов сыворотки, облегчающих прикрепление и распластывание клеток на поверхности культуральной посуды. Более того, антитела к фибронектину индуцируют появление у нормальных клеток некоторых свойств трансформированных клеток.

Фибронектин нельзя относить к интегральным мембранным белкам, поскольку он может быть удален с клеточной поверхности при обработке клеток 1 М мочевиной. Молекулы фибронектина весьма гибки и состоят из нескольких, лабильно связанных доменов (Alexander et al., 1978). На клеточной поверхности фибронектин образует относительно неподвижную фибриллярную сеть, связанную через мембрану клетки с элементами цитоскелета (Lasarides et al., 1979).

2.4. *Дифференцировочные функции в культуре клеток*

В большинстве случаев клетки, полученные из первичных культур, быстро возвращаются к недифференцированному фибробластоподобному или эпителиоподобному типу. Вместе с тем выделяется все большее количество клеточных линий, в которых клетки сохраняют некоторые функции исходных тканей. Одной из главных проблем в установлении линий дифференцированных клеток является присутствие в исходном эксплантате гораздо более быстро растущих недифференцированных фибробластов (см. гл. 15 и рис. 6.2). В обычных условиях эти фибробласты быстро вытесняют дифференцированные эпителиальные клетки. В некоторых случаях, однако, быстрое прикрепление фибробластов к субстрату может быть использовано для их удаления из смешанной культуры (Yaffe, 1968; Rheinwald, Green, 1975).

Было показано (Puri, Turner, 1978), что в отсутствие сыворотки только фибробласты мышечной ткани куриных эмбрионов могут прикрепиться к субстрату, а миобласты остаются в суспензии и могут быть выделены путем пересева в следующий сосуд в присутствии сыворотки (разд. 15.5).

При первых попытках получения линии асцитных клеток из солидной гепатомы (Thompson et al., 1966) была получена устойчивая линия культивируемых клеток (культура клеток гепатомы HTC), отвечавших на дексаметазон (аналог стероидных гормонов) индукцией тирозинтрансаминазы, т. е. сохраняющих типичный для клеток печени ответ.

Существует другой метод удаления быстрорастущих фибробластов. Из опухоли готовят культуру первичных клеток, и после короткого времени эти клетки инокулируют животным, в которых они вновь образуют опухоли. Чередование роста этих

клеток in vitro и in vivo позволяет отбирать опухолевые клетки. Используя этот метод, можно с успехом получать линии дифференцированных клеток из тканей надпочечника, гипофиза и нейральных тканей (Buonassisi et al., 1962; Augusti-Tocco, Sato, 1969).

Потеря способности к дифференцировке часто связана с высокой скоростью роста клеток в культуре, так как при подавлении скорости роста или синтеза ДНК наблюдается восстановление дифференцировочных функций. Так, линия гипофизарных клеток крысы, обычно продуцирующая гормон роста (СТГ), после обработки бромдексиуридином в концентрации 3 мкг/мл приобретает способность синтезировать пролактин (Biswas et al., 1977). Клетки эритролейкоза Френд (разд. 15.1) в результате обработки диметилсульфоксидом или масляной кислотой прекращают деления и начинают синтезировать гемоглобин.

В гл. 15 рассмотрены некоторые клеточные системы, в которых можно индуцировать дифференцировку in vitro.

2.5. *Фирмы-поставщики и транспортирование*

Некоторые первичные клетки могут быть приобретены у фирм-поставщиков (например, Flow Lab. и Gibco Biocult; приложение 3), а методы получения первичных культур описаны в гл. 6. Если фирма-поставщик расположена неподалеку и может поставлять клетки в день выделения, то такой источник клеток вполне приемлем. В других же случаях культуры первичных клеток следует получать самостоятельно. Во всех случаях самостоятельное получение первичных культур необходимо при использовании тканей экспериментальных животных.

Штаммы и линии клеток легко могут быть получены от фирм-поставщиков или из Американской коллекции типовых культур (АТСС), где они содержатся вместе со своими предшественниками. Получение клеток из АТСС стоит дорого, и если исследователь не имеет достаточного опыта культивирования клеток, то следует передать получение клеток близлежащей фирме-поставщику, чтобы обеспечить их последующую бесперебойную поставку.

АТСС поддерживает стоки (stocks — маточные культуры, концентраты, клеток в замороженной в жидком азоте форме (разд. 8.3) и транспортирует их замороженными в твердой углекислоте. Поскольку клетки обладают низкой жизнеспособностью при температуре сухого льда, то сразу после получения их следует использовать или перезаморозить в жидком азоте.

Незамороженные клетки можно транспортировать в виде монослоя либо в сосуде, содержащем лишь следы культуральной среды, либо в сосуде, полностью заполненном средой. В обоих случаях сосуды должны быть прочно закупорены для

избежания испарения среды, и внешняя температура при транспортировке не должна выходить из диапазона 10—37 °С. Даже в этих случаях может происходить повреждение клеток, так что этот метод транспортировки пригоден только для небольших расстояний.

Среды и сыворотки для клеточных культур проще всего получать от специализированных фирм, таких, как Flow Laboratories или Gibco Biocult (приложение 3). Можно покупать среды, которые требуют только лишь добавления сыворотки перед использованием, но предпочтительнее использовать концентрированные и сухие среды, особенно при необходимости больших количеств среды. Вопросы, связанные с использованием концентратов и сухих сред, рассматриваются в гл. 7 и приложении 1.

Глава 3

Посуда, используемая при культивировании

3.1. *Выбор посуды*

При выборе посуды следует учитывать следующие факторы:

1. Растут ли клетки в суспензии или в монослое?
2. Масштаб эксперимента, т. е. являются ли объектом исследования индивидуальные клетки или они требуются в граммовых количествах? С точки зрения биохимика должна быть принята во внимание также потребность в последующих манипуляциях с клетками.
3. Допустим ли газовый обмен с атмосферой или культуральные сосуды должны быть закупорены?

3.1.1. *Газовый обмен*

Газовый обмен возможен: это имеет место при использовании чашек Петри, пластинок для культур клеток и некоторых типов сосудов для суспензионных культур. Когда используемая среда забуферивается бикарбонатом (30 мМ), необходимо, чтобы эти культуры находились в смеси 5% CO_2 с воздухом. Это обеспечивает поддержание правильного pH , который легко контролируется по цвету присутствующего в среде фенолового красного. Среда должна быть томатного цвета, что соответствует pH 7,2, но не желтого или красного и ни в коем случае не пурпурного. При забуферивании среды до pH 7,2 с помощью буфера Hepes (20 мМ; разд. 7.2.1) отпадает необходимость в контроле pCO_2 окружающей атмосферы. В некоторых случаях, особенно при клонировании клеток, буфер Hepes (20—25 мМ) используется в комбинации с бикарбонатом (8 мМ), и в этих случаях культуральные сосуды должны содержаться в атмосфере с 2—3% CO_2.

3.1.2. *Закупоренные сосуды*

К этой группе относятся бутыли с пробкой или тщательно закручивающейся крышкой и закупоривающиеся сосуды для культивирования суспензий. Если среда забуферивается буфером Hepes, то отпадает необходимость контролировать поддержание pH на ранних стадиях роста культуры. При забуферивании среды бикарбонатом в сосуд перед закупориванием следует

Таблица 3.1

Сосуд	Площадь поверхности, см²	Объем среды, мл	Типовой объем	
			инокулята	100% CO_2[1])
Мультипластинки, или пластинки для титрования	0,3	0,1	$<1\cdot10^4$	—
Пластинки ТС	2	0,5	$5\cdot10^4$	—
Чашки 5 см	19,4	5	$3\cdot10^5$	—
Чашки 9 см	63	10	$1\cdot10^6$	—
Бутыли 60 мл	16	5	$4\cdot10^5$	3 мл
Бутыли 125 мл	22	10	$6\cdot10^5$	6 мл
Бутыли 250 мл	30	15	$1\cdot10^6$	12 мл
Бутыли Рауса	200	50	$3\cdot10^6$	50 мл
Бутыли Томпсона	375	100	$4\cdot10^6$	70 мл
Винчестер	1500	150	$2\cdot10^7$	120 мл
Фабрика клеток Nunc	10×600	1500	$1\cdot10^8$	—

[1]) Объем CO_2, необходимый для доведения концентрации CO_2 в атмосфере воздуха до 5%.

добавить CO_2. Это достигается продуванием сосуда воздухом, содержащим 5% CO_2, в течение 15 с или введением в сосуд фиксированного объема CO_2 (см. табл. 3.1 для расчета требуемого объема и рис. 3.1). В обоих случаях CO_2 должен вводиться через стерилизованную пастеровскую пипетку с ватным тампоном.

Воздух, содержащий 5% CO_2, может быть получен непосредственно из баллонов, поставляемых фирмами, например British Oxygen Company Ltd., либо путем смешивания воздуха с CO_2, поставляемым Distillers Co., Ltd. Соответствующие миксеры встраиваются во многие установки для культивирования. Однако их можно легко собрать из двух измерителей газопротока и одного воздушного насоса (рис. 3.1).

Специализированные установки для культивирования с контролируемым протоком CO_2 поставляются многими фирмами, указанными в приложении 3, например Bellco, Forma, Gallenkamp, Grant, Heraeus и Leec.

3.1.3. *Техника перфузии*

В этих случаях газообмен новой среды осуществляется в сосудах, предшествующих сосуду, в котором растут клетки.

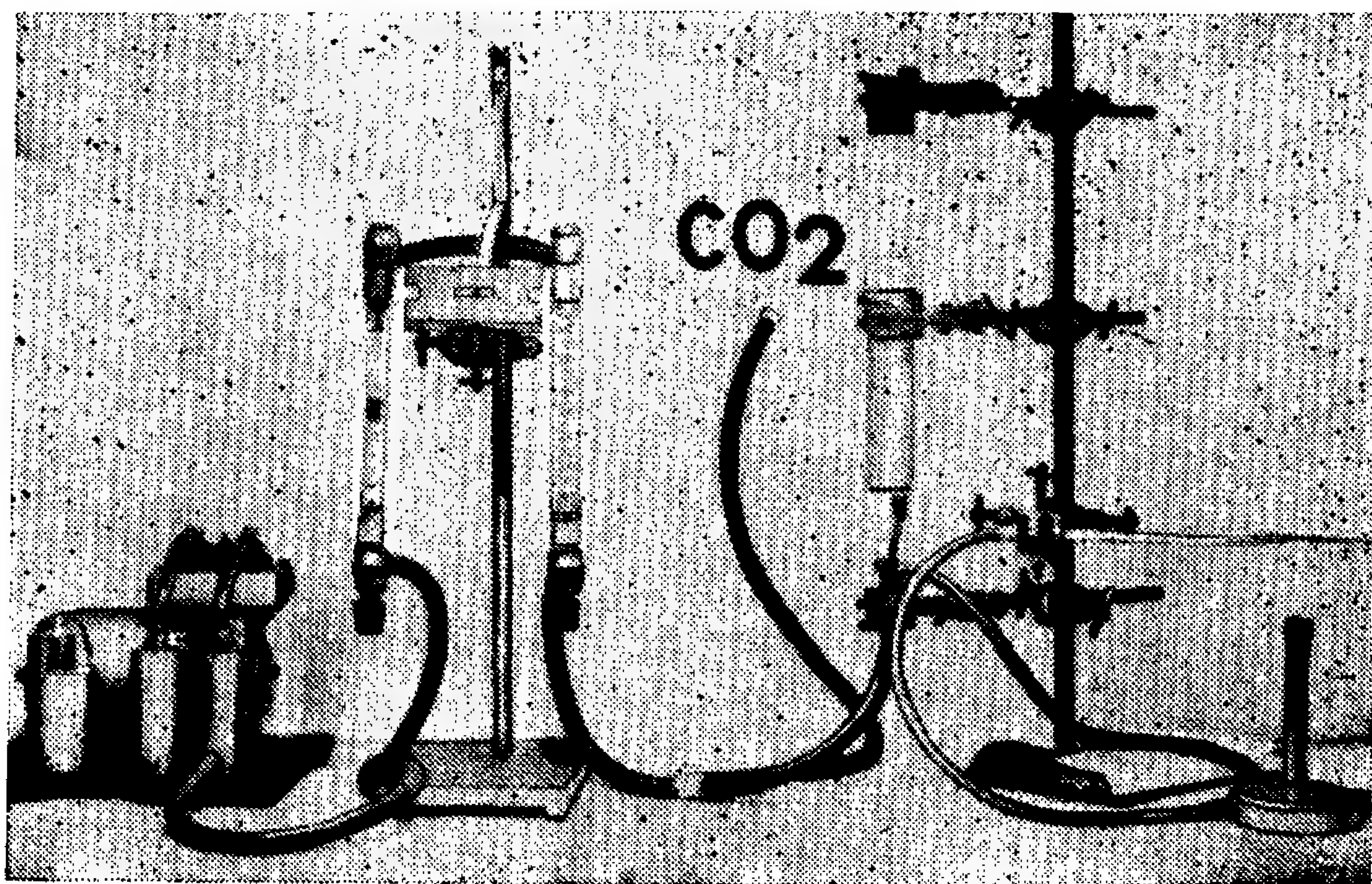


Рис. 3.1. Системы снабжения CO_2. Слева — фотография простой установки, в которой газ от воздушного насоса смешивается с CO_2 до конечной концентрации последнего (5%) для газирования культуральных сосудов или питания установок для культивирования. Справа — установка для отмеривания фиксированных объемов CO_2 и подачи их через трехходовой кран (в нижней части шприца) и стерильную пастеровскую пипетку в культуральный сосуд.

3.2. Монослойные культуры

3.2.1. Мелкомасштабные культуры (рис. 3.2)

Тем, кто интересуется вопросами клонирования, следует обратиться к гл. 8.

Мелкомасштабные перфузионные сосуды рассматриваются в разд. 3.2.3.3.

Для многих биохимических исследований, в том числе для инкубации клеток с радиоактивными изотопами в присутствии ядов, антиметаболитов, гормонов и так далее, требуется небольшое количество клеток. Эти клетки могут быть выращены на дне стеклянных флаконов для сцинтилляционных счетчиков, на стеклянных покровных стеклах диаметром 1,5 см или даже в лунках пластинок для микротитрования (см. разд. 1.3.7 и табл. 3.1). Последний метод позволяет получать одновременно 96 одинаковых культур, но объем среды в каждой лунке не превышает 0,25 мл.

При использовании покровных стекол наилучшие результаты получаются, когда их помещают в лунки подносов для культуры ткани. В каждую лунку с покровным стеклом следует добавлять 0,5 мл среды, причем величина начального инокулята должна составлять примерно 20 000 клеток.

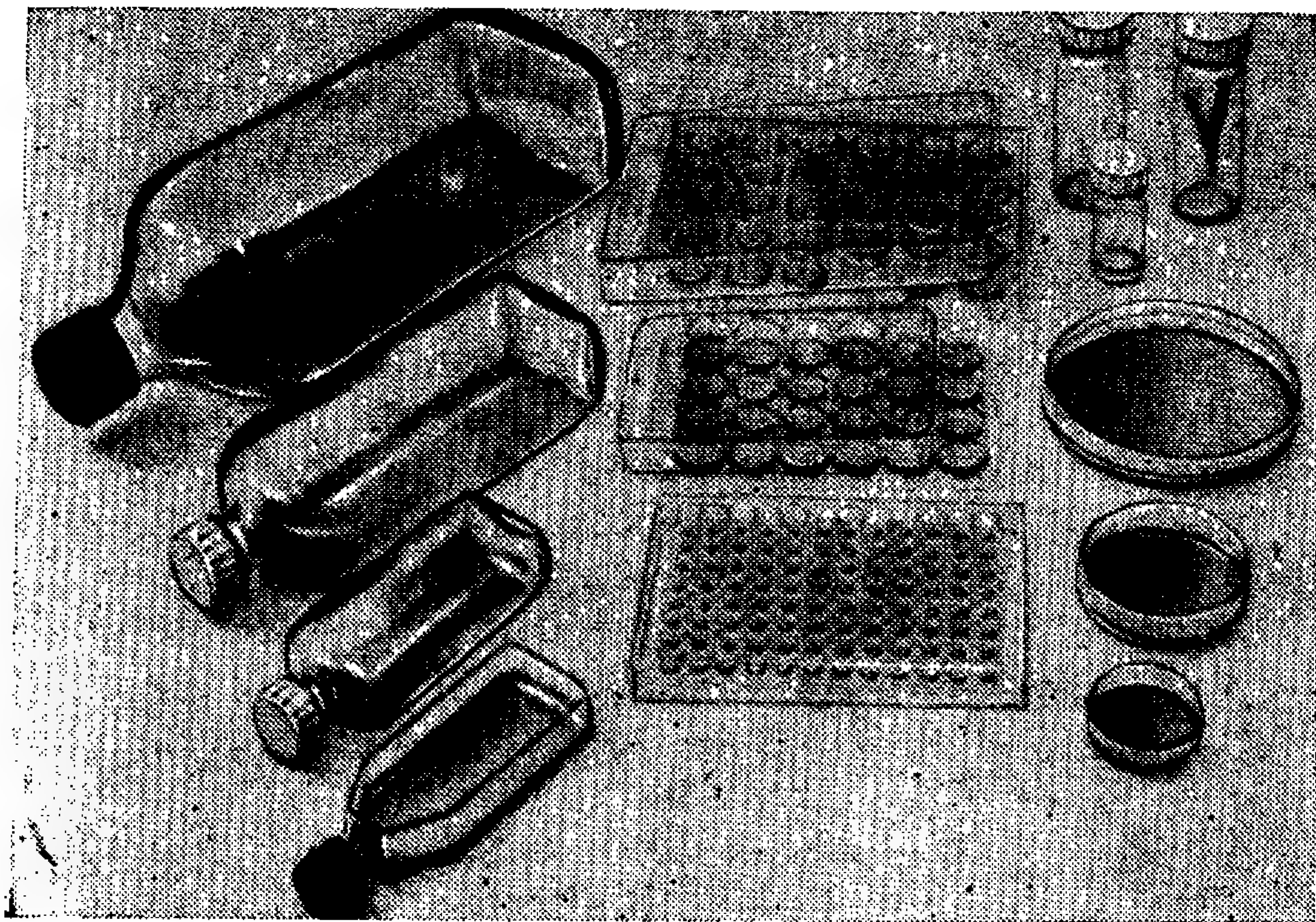


Рис. 3.2. Сосуды для культивирования клеток. Слева — бутыль Ру, плоские медицинские бутыли двух размеров 125 и 250 мл и маленький флакон Фалькона. В центре — два типа пластинок, обеспечивающих культивирование 24 покровных стекол в отдельных лунках (Линбро и Фалькон), и пластинка для микротитрования с 96 лунками. Справа — чашки Петри трех размеров и выше них — два универсальных контейнера и маленькая бутыль. В одном из универсальных контейнеров помещены три наконечника для автоматической пипетки, готовые для стерилизации в автоклаве.

В случае флакона для сцинтилляционных счетчиков требуется вдвое больше начального инокулята, но культуральная посуда этого типа имеет определенное преимущество — в конце эксперимента упрощается обработка меченых клеток перед определением включившейся в них радиоактивности.

В пластиковые чашки Петри диаметром 5 см перед посевом клеток можно поместить несколько покровных стекол; достоинство такого метода культивирования состоит в том, что каждая культура на покровном стекле поддерживается в идентичных условиях.

Прежде чем использовать в культуре клеток покровные стекла, их необходимо тщательно вымыть. Для этого стекла следует погружать поодиночке в кипящую 0,1 н NaOH или хлорос, промывать в течение ночи в проточной воде и затем ополаскивать дистиллированной водой. Затем стекла следует высушить на чистой ткани и стерилизовать сухим жаром в стеклянных чашках Петри.

Пластиковые сосуды для культивирования клеток поставляются в стерилизованном виде непосредственно фирмами-поставщиками (Nunc, Falcon, Linbro, см. приложение 3).

3.2.2. Культуры промежуточного масштаба

Клетки можно выращивать в чашках или бутылях, когда размер первичного инокулята варьирует в пределах от $0{,}2\times10^6$ до 2×10^6. Сосуды могут быть пластиковые или стеклянные. Пластиковые сосуды поставляются фирмами в стерилизованном виде и должны быть специально предназначены для использования в культуре клеток. В качестве стеклянных бутылей обычно используются плоские медицинские бутыли, но для культивирования клеток можно использовать любую бутыль с плоской боковой стенкой при условии, что перед использованием она будет тщательно вымыта и простерилизована (гл. 4).

Некоторые стеклянные бутыли, например бутыли Ру, специально производятся для выращивания клеток; их преимущество перед другими бутылями заключается в улучшенных оптических свойствах, что облегчает микроскопический анализ растущих клеток. Некоторые бутыли большого размера называют по имени исследователей, впервые предложивших их использование.

3.2.3. Крупномасштабные культуры

3.2.3.1. Вращающиеся сосуды

Простейшими сосудами такого рода являются вращающиеся бутыли. Это могут быть бутыли Винчестера объемом 2 и 2,5 л или любая из промышленных круглых бутылей с достаточно хорошими оптическими свойствами. Клетки растут на внутренней поверхности бутылей (площадь поверхности вплоть до 2000 см^2) и постоянно омываются средой (около 150 мл на бутыль) в ходе вращения бутылей. Аппараты для вращения бутылей поставляются различными фирмами (например, Lukham and Voss Instr.; приложение 3), но используются также аппараты собственной конструкции (рис. 3.3). На кафедре биохимии университета в Глазго сконструирована одна такая машина, способная вращать до 120 бутылей. Скорость вращения бутылей не должна превышать 1 об/мин, но даже такая скорость оказывается чрезмерной для некоторых клеток на ранних стадиях роста, когда вращение бутылей со скоростью 0,25 или 0,5 об/мин облегчает прикрепление клеток к поверхности стекла.

Фирма Sterilin Ltd. (приложение 3) поставляет полистирольные бутыли объемом 2 л, содержащие внутри свернутые в спираль листы из мелинекса (ICI Ltd) размером 200×20 см с расстоянием между слоями 4 мм. Бутыль заполняется 1,6 л культуральной среды, содержащей 0,4 мл MS антипенной эмульсии RD (Hopkin, Williams) и примерно 10^8 клеток. Бутыль помещают в аппарат для вращения и дают клеткам прикрепиться

в течение ночи, после чего бутыль устанавливают вертикально и продувают воздухом, содержащим 5% CO_2. Клетки можно удалять трипсинизацией, что создает существенное неудобство при изучении импульсного мечения или свойств клеточной поверхности. Бутыль можно также разрезать горячей проволокой, а прикрепившиеся клетки можно соскоблить со спирального листа. При выращивании в этих бутылях клеток ВНКК21С13 можно получить 20-кратное увеличение их количества в течение 4 суток культивирования (House, 1973).

Аналогичные, но несколько большего размера системы Rola Cartridge поставляются фирмой Flow Laboratories (приложение 3). Эти системы состоят из пригодных для автоклавирования контейнеров объемом 2,27 л, в которые помещаются стери-

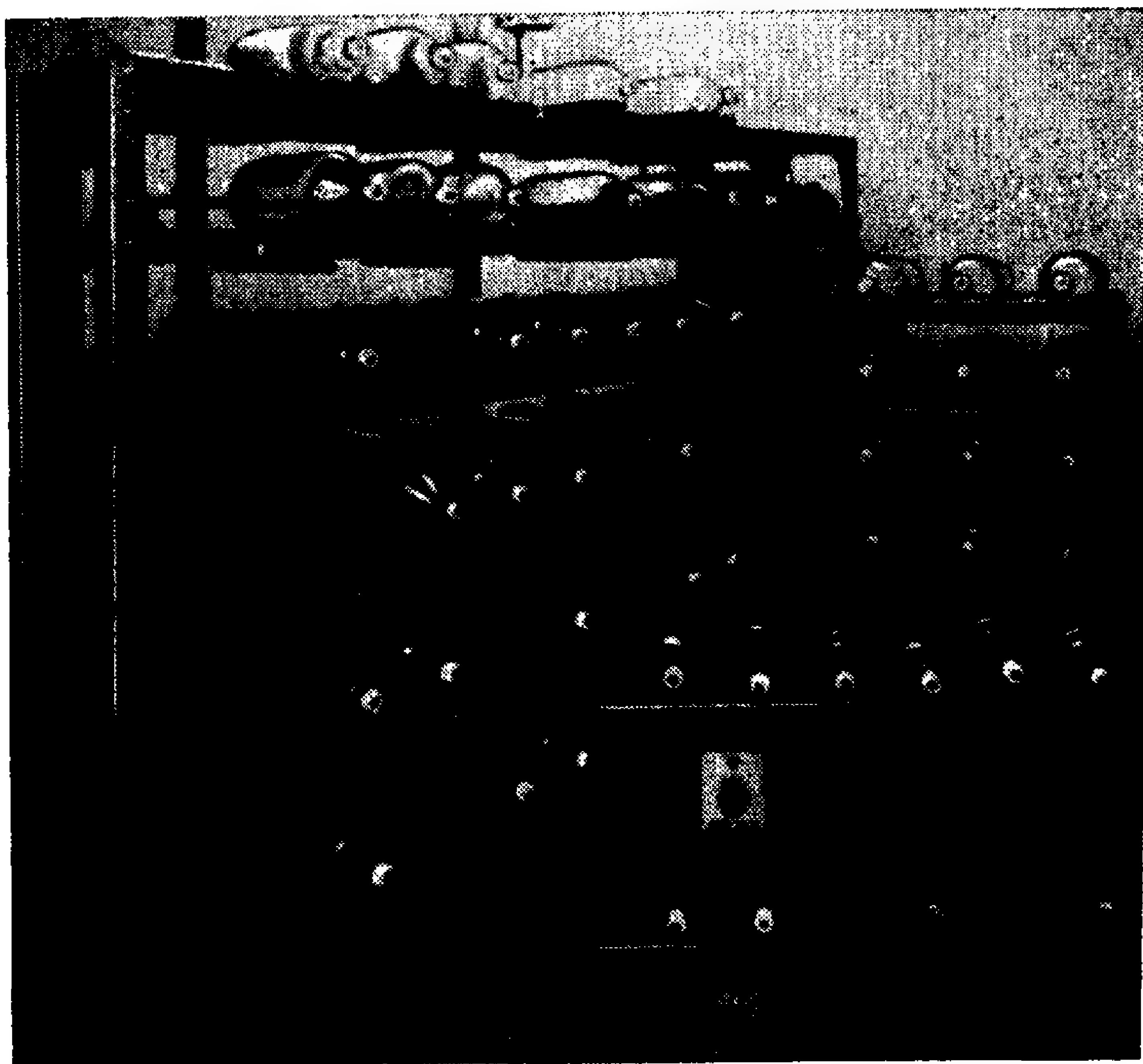


Рис. 3.3. Установки для вращающихся бутылей. На фотографии показаны три различные модели. Справа сзади — 6-секционная модель Лукмана (Luckman), модифицированная производителем путем установки более мощных двигателей. Модель очень тяжела в управлении и рассчитана на применение только стандартных (4½″) бутылей Винчестера, по три на каждую секцию. Справа впереди — две секции разъемной модели, выпускаемой фирмой Voss Instruments. Каждая секция снабжена отдельным двигателем. Слева — модель, предложенная Гарвеем (Harvey; отделение биохимии, университет в Глазго). Двигатель перемещает резиновую ленту, которая вращает бутыли, закрепленные на маленьких шкивах. Каждый двигатель вращает 40 бутылей.

лизованные патроны, состоящие из 40 дисков с площадью поверхности 157,4 см^2 каждый. При культивировании в аппарате для вращения требуется более 1 л среды, чтобы покрыть все клетки. В конце роста культуры система может быть разобрана, что облегчит удаление клеток. Опыт использования этой системы, однако, показывает, что происходит потеря среды из незакупоренных контейнеров, так что этот тип сосудов должен использоваться с осторожностью.

Фирма Abbot Laboratories (приложение 3) изготавливает массовый пропагатор культуры ткани Mass Tissue Culture Propagator (MTCP), в котором клетки растут на стеклянных пластинах в большом цилиндре, через который пропускают воздух, содержащий 5% CO_2 (Schleiter, 1973), и фирма Connaught Laboratories (приложение 3) производит аналогичный пропагатор клеток Multi-Surface Cell propagator. Эти аппараты дороги и трудны в эксплуатации, однако они позволяют получать до 100 г клеток. Кроме того, их можно разбирать, что дает два главных преимущества: 1) можно проводить механическое удаление клеток с пластин и 2) аппараты пригодны для повторного использования, и хотя они дороги, они не требуют дополнительных затрат в ходе эксплуатации. Лица, обслуживающие аппараты, должны чистить и стерилизовать их перед повторным использованием.

3.2.3.2. Фабрика клеток

Фирма Nunc (Gibco-Biocult; приложение 3) производит аппараты, представляющие собой 10 спаянных друг с другом пластин — мультипластинчатые блоки или «фабрики» клеток (рис. 3.4). Площадь поверхности для роста клеток достигает 6000 см^2, и они не требуют для эксплуатации вращательных установок. Суспензия клеток (около 1,5 л) переливается из бутылей менее чем за минуту, и клетки (более 10^9) могут быть легко собраны с помощью трипсинизации.

Для механического отделения клеток аппарат необходимо разрезать горячей проволокой. Эти «фабрики» весьма дороги и пригодны только для одноразового использования. Следует учитывать, однако, что «фабрики» обеспечивают очень высокий выход клеток при использовании ограниченного пространства и в отличие от вращающихся бутылей не требуют дополнительного оборудования, которое само по себе дорого и может отказать в самый критический момент. В связи с одноразовостью использования «фабрики» поставляются в стерильном виде, что снижает вероятность заражения клеток в ходе эксперимента. Некоторые лаборатории имеют подставки для установки нескольких фабрик, что позволяет одному сотруднику проводить одновременный посев или сбор клеток со всех аппаратов.

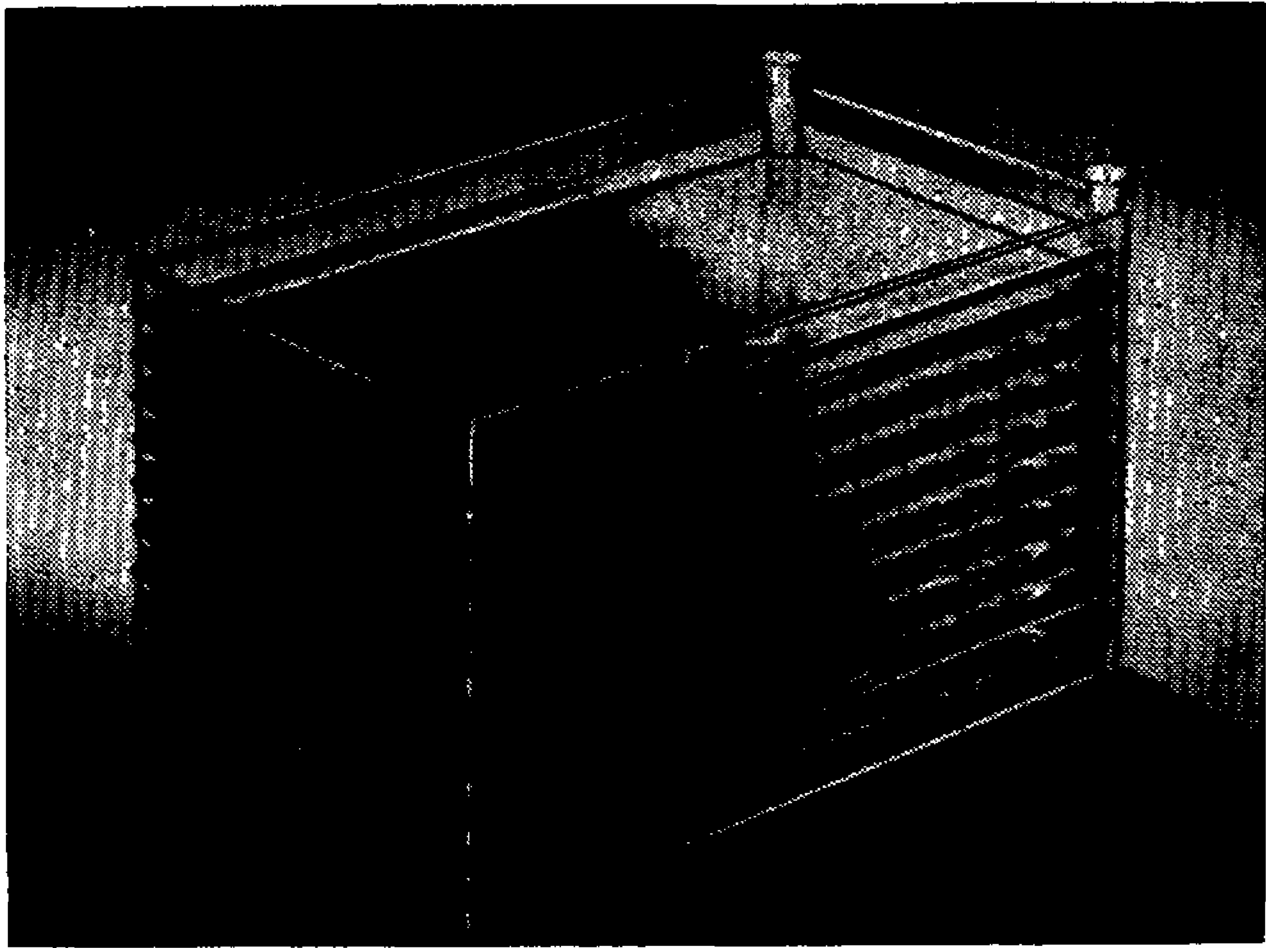


Рис. 3.4. Фабрика клеток Nunc. (С разрешения Nunc и Gibco Biocult.)

При заполнении блок кладется на бок, и специальное устройство входного канала обеспечивает равномерное распределение клеточной суспензии между десятью камерами. Блок переворачивается затем на другой бок для предотвращения перемешивания среды между камерами и затем устанавливается горизонтально. Некоторым недостатком многопластинчатого блока является потребность в большом количестве клеточной суспензии при первоначальном заполнении, но эта трудность легко преодолима при использовании однопластинчатых блоков, также поставляемых фирмой Nunc.

3.2.3.3. Перфузионные сосуды

Были разработаны различные другие методы, позволяющие увеличить рабочую поверхность сосуда, на которой могут расти клетки. Во всех случаях проблема заключается в необходимости поддержания адекватного обеспечения клеток питательными веществами, включая кислород, и отведения продуктов отхода, особенно кислот. Фирма New Brunswick Scientific Co. (приложение 3) производит аппараты, обеспечивающие постоянную перфузию вращающихся бутылок с помощью вращающихся пробок, через которые проходят различные питающие трубки.

Перфузионные сосуды для мелкомасштабных культур поставляются в стерильном виде фирмой Sterilin Ltd. (приложение 3). Эти сосуды пригодны для проведения цейтраферной киносъемки. Объем камеры составляет только 4 мл, но она мо-

жет быть смонтирована на подогреваемом столике микроскопа, что позволяет проводить непрерывное фотографирование индивидуальных клеток. Среда может циркулировать через рубашку, окружающую культуру, протекая через маленькие отверстия в боках камеры (Cruickshank et al., 1959). Покровное стекло, на котором растут клетки, может быть удалено для окраски клеток или каких-либо других обработок.

3.2.3.4. *Капиллярные подложки*

Одним из факторов, лимитирующих рост фибробластов, является недостаточное содержание в среде необходимых компонентов (Dulbecco, Elkington, 1973). Следовательно, для получения высокой плотности клеток необходима периодическая замена питательных веществ. А это приводит к постоянному изменению состава среды, омывающей клетки, что весьма нежелательно. Культуры клеток на искусственных капиллярных подложках лишены этого недостатка, но до сих пор не получили достаточного распространения частично из-за трудностей в эксплуатации и частично в связи с проблемами, возникающими при сборе клеток.

Фирмы Amicon Corp. и Bio-Rad Laboratories (приложение 3) поставляют различные сорта капиллярных подложек. Они изготавливаются на основе полупроницаемых мембран, производимых этими фирмами для диализа и концентрирования клеток. Используются два сорта капилляров: один для обмена небольших молекул в растворе и другой из силиконполикарбоната для обеспечения газообмена. Пучок капилляров (около 150) вставляется в трубку, в которую через специальное отверстие сбоку вводится суспензия клеток (около 10^6 клеток в 3 мл среды) (рис. 3.5). После прикрепления клеток к подложке через трубку пропускается среда, насыщенная воздухом, содержащим 5% CO_2 (для поддержания pH). Скорость протока среды через капиллярные подложки составляет 1,0 мл/мин. Газы хоро-

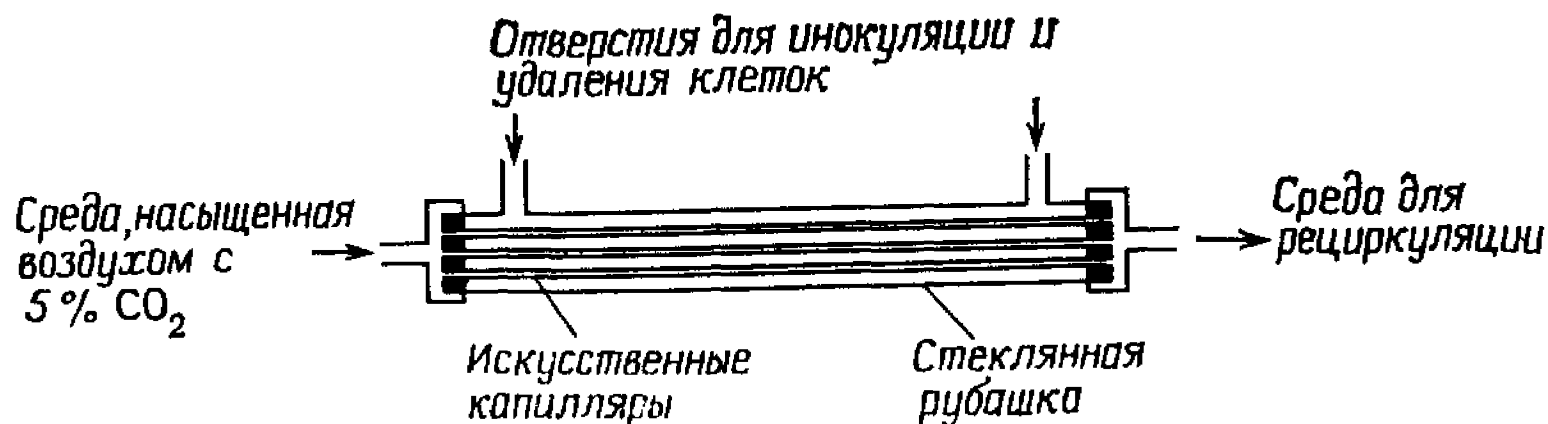


Рис. 3.5. Схема капиллярной перфузионной подложки.

шо диффундируют через силиконовые трубки, используемые для подведения перфузионной среды.

Около 100 мл перфузионной среды используются в режиме рециркуляции в течение двух суток, после чего производится замена перфузионной и внекапиллярной среды. Клетки сохраняют жизнеспособность в течение месяца и более, и три соединенные параллельно маленькие установки позволяют получить более $2 \cdot 10^8$ клеток. Этот метод чрезвычайно удобен для производства или метаболического превращения метаболитов. Так из перфузата клеток хориокарциномы человека может быть выделен человеческий хорионический гонадотропин (Odell et al., 1967; Knazek, Gullino, 1973; Knazek et al., 1974).

3.3. Суспензионные культуры

Большинство клеток плохо растут в суспензии, так что этот метод имеет ограниченную применимость. Лимфоциты, однако, не обнаруживают тенденции к адгезии к поверхности стекла или пластика и выживают на дне пробирки, чашки или бутыли под тонким слоем среды. Другие клетки, способные к росту в суспензии, должны отбираться на основе их плохой адгезии к субстрату и способности к продолжению роста в суспендированной форме. Если не проводить постоянного перемешивания, клетки осаждаются и прикрепляются к субстрату. Для некоторых клеток достаточно их содержания во вращающихся бутылях при скорости вращения 2 об/мин, но обычно требуются специальные сосуды для культивирования суспензий и использование среды с дефицитом Mg^{2+} и Ca^{2+}.

Сосуды для суспензионных культур могут быть разного размера (от 10 мл до 10 л) и имеют внутри магнит, подвешенный как раз над дном сосуда.

Магнит вращается магнитной мешалкой, на которую устанавливается сосуд. Поскольку большинство стандартных магнитных мешалок при длительной работе нагреваются, сосуды должны быть защищены от этого избытка тепла слоем пенопласта, расположенным между ними и мешалкой. Сосуды с мешалкой «Bellco» (рис. 3.6) поставляются фирмой Arnold Horwell Ltd. (приложение 3).

Суспензионные культуры лучше растут внутри ограниченного диапазона концентраций клеток и в том случае, когда сосуд наполнен средой наполовину. Для обеспечения этих условий необходимо уделять культурам постоянное внимание. Каждый день, или — в случае медленно растущих культур — через день, следует удалять половину суспензии через боковое горлышко и добавлять равный объем свежей среды.

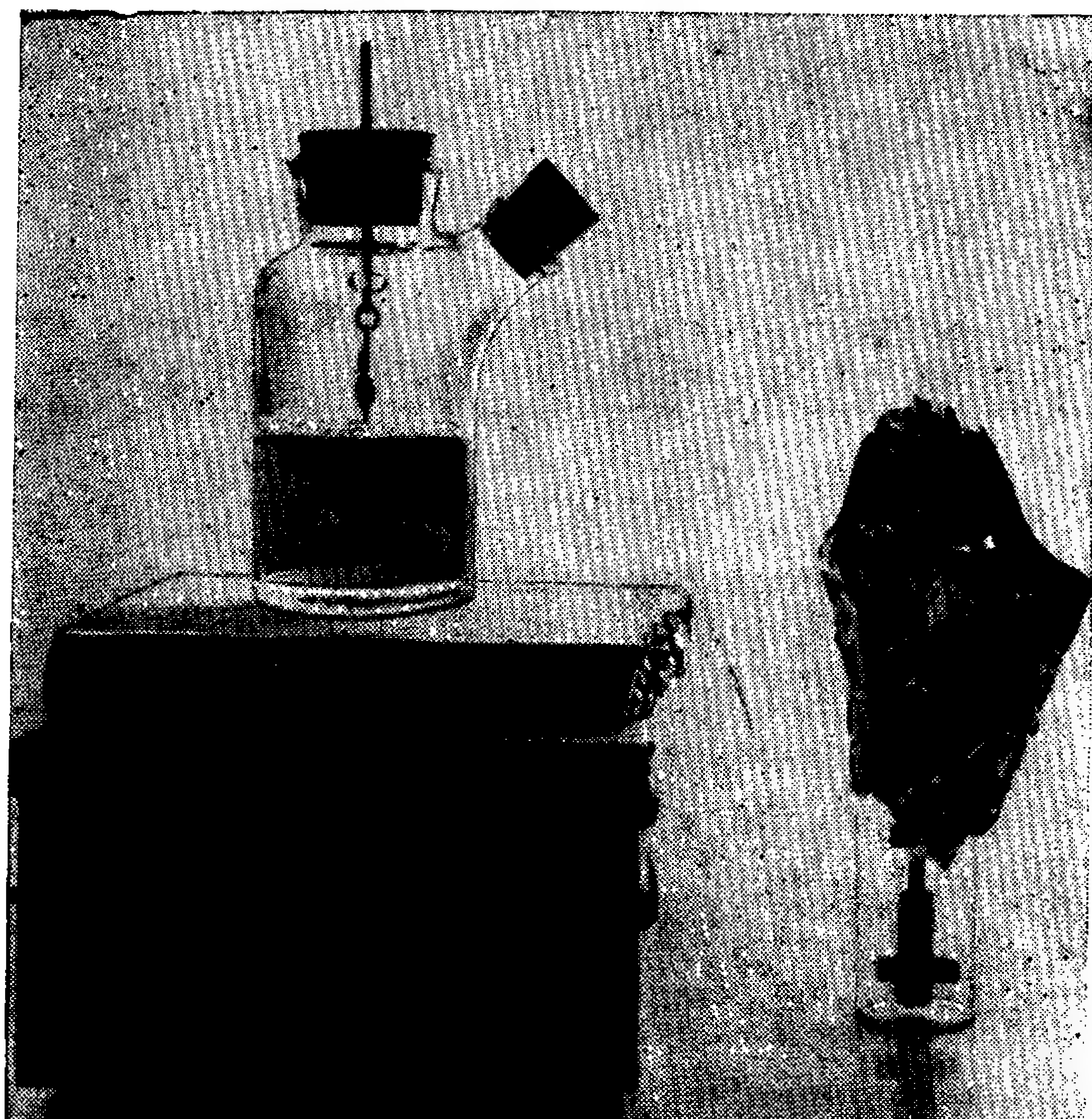


Рис. 3.6. Флаконы с мешалкой. Флакон на магнитной мешалке защищен от излишнего нагревания слоем пенопласта. Сосуд справа покрыт алюминиевой фольгой для стерилизации. Модель с жестким винтом, обеспечивающим одновременность вращения верхней и нижней частей, предпочтительнее модели с шарнирным соединением (слева), поскольку в последней возможно неравномерное вращение.

3.4. Микроносители

Микроносители представляют собой мелкие твердые частицы (поддерживаемые в суспензии благодаря перемешиванию), на которых клетки растут в форме монослоя. Использование микроносителей дает клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур. Поверхность бус-микроносителей может иметь положительный заряд, а различные клетки характеризуются оптимальным ростом при несколько различных поверхностных зарядах. По уверению фирмы Flow Laboratories (приложение 3), выпускаемые ими «супербусы» обладают поверхностным зарядом, пригодным для «максимального» числа типов клеток.

Плотность микроносителей должна быть близка к 1 для обеспечения их лучшего суспендирования; описаны препараты бус диаметром 100—350 мкм из ДЭАЭ-сефадекса А-50 (Van Wezel, 1973).

«Супербусы» фирмы Flow Laboratories имеют диаметр 150—300 мкм и используются в концентрации 5 г/л, что позволяет рассматривать их как недорогой заменитель сосудов для крупномасштабного культивирования в монослое. Суспензия супербус обеспечивает легкий отбор образцов и не затрудняет наблюдения клеток, поскольку сами супербусы практически прозрачны. Существенно, однако, при достижении очень высокой плотности культуры предотвращать накопление кислоты. При посеве $3 \cdot 10^7$ клеток в 100 мл суспензии количество клеток увеличивается в 10—15 раз в течение 5 суток. Для поддержания необходимого рН рекомендуется комбинация буфера Hepes и бикарбоната. В лучших системах используется контролируемое рН-статом непрерывное добавление бикарбоната.

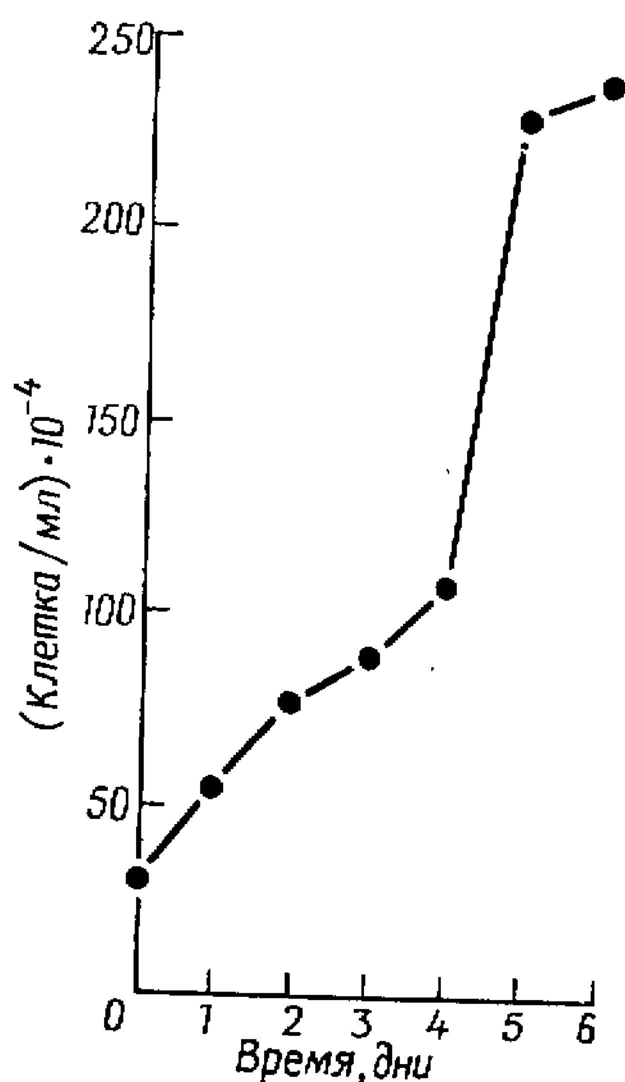


Рис. 3.7. Рост клеток на супербусах Flow. $30 \cdot 10^6$ клеток ВНК21/С13 помещают в 100 мл ростовой среды, содержащей 0,5 г супербус Flow. Перемешивание осуществляется, как в суспензионной культуре. Рост клеток продолжается в течение 6 суток. (Перепечатано по разрешению Dr. David Lewis, Flow Laboratories.)

Для сбора клеток бусы осаждают в поле силы тяжести, а культуральную среду заменяют 0,25%-ным трипсином в свободном от кальция и магния сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) Эрла. Суспензию перемешивают при 37 °С в условиях постоянного микроскопического контроля отделения клеток, которое может требовать интенсивного пипетирования. Освобождающиеся клетки могут быть отделены от бус с помощью стеклянного фильтра либо в суспензию можно добавить новые бусы и свежую среду и разлить суспензию по новым сосудам для дальнейшего роста.

Дэвид Льюис из Flow Laboratories выращивал на «супербусах» следующие клетки: первичные клетки почки обезьяны, клетки эмбрионального легкого человека, эмбриональные клетки миндалин человека, WI-38, клетки эмбриональной почки крупного рогатого скота, клетки эмбриональных семенников крупного рогатого скота, ВНК21, СНО-К2, мышиные макрофаги.

На рис. 3.7 представлен график скорости роста клеток

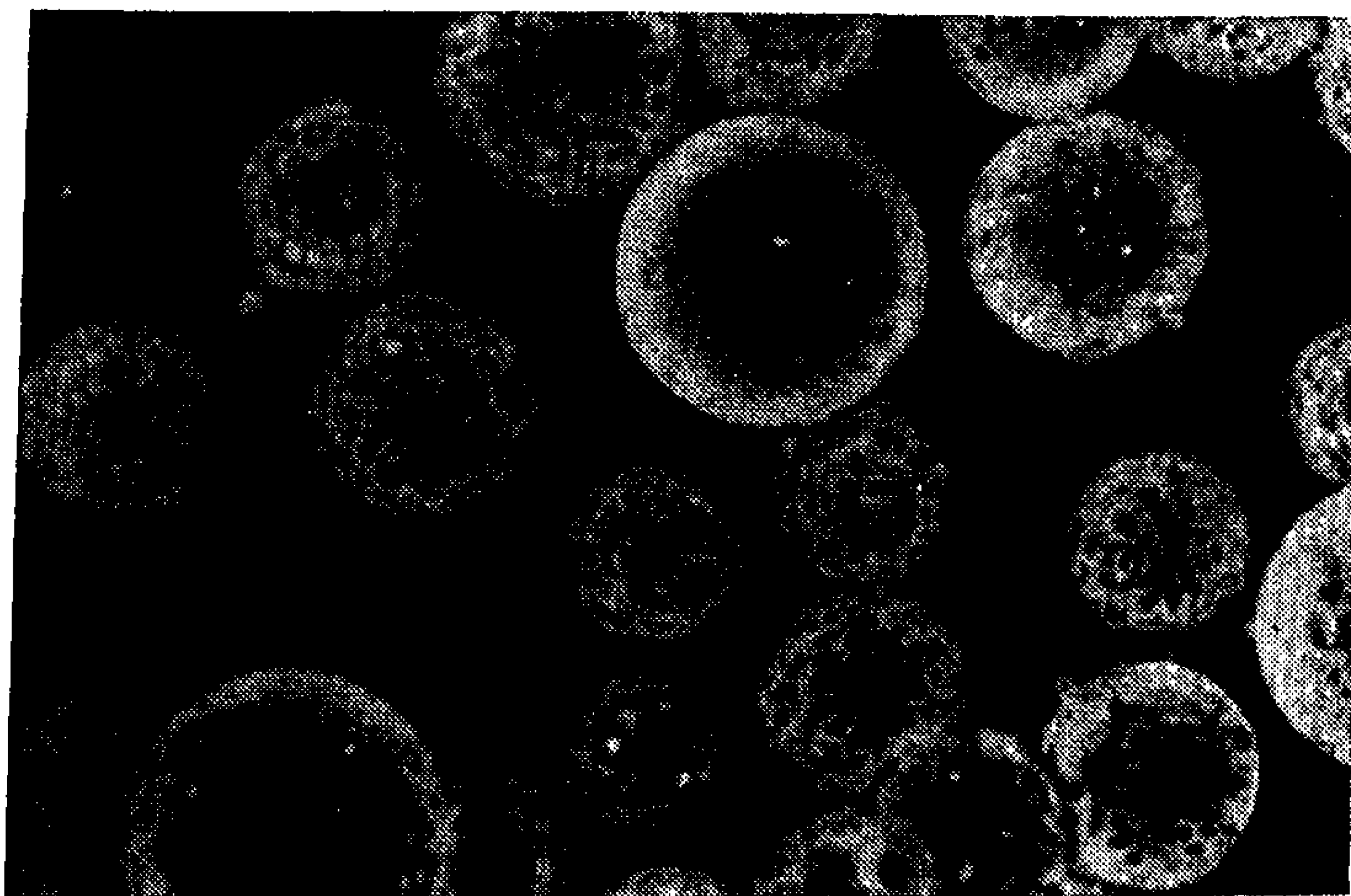


Рис. 3.8. Клетки СНО-К1, растущие на супербусах Flow. (Перепечатано по разрешению Dr. David Levis, Flow Laboratories.)

ВНК21 на супербусах, а на рис. 3.8 приведена микрофотография клеток СНО, выращенных на супербусах.

«Цитодекс 1», который недавно стал выпускаться фирмой Pharmacia Ltd. (приложение 3), представляет собой бусы-микроносители на основе сефадекса с плотностью 1,03 г/мл и средним диаметром 195 мкм в ФСБ. Площадь поверхности 1 г бус равна 0,6 м^2, что эквивалентно 4—6 вращающимся бутылкам или 100 чашкам Петри диаметром 9—10 см (см. табл. 3.1). Теоретически 1 г цитодекса 1 должен обеспечивать выход $2{,}2 \cdot 10^9$ клеток. На практике при инкубации 25 млн. клеток в 500 мл ростовой среды, содержащей 1—2 г цитодекса 1, на 7-й день культивирования образуется 500 млн. клеток, и к этому времени наступает истощение среды.

В отличие от супербус фирмы Flow Laboratories бусы цитодекс 1 поставляются в сухом виде, в связи с чем их можно использовать только после их набухания в ФСБ и автоклавирования. В сухом виде бусы стабильны более двух лет.

В отчете фирмы Pharmacia (1978) сообщается об успешном росте на цитодексе 1 следующих клеток: клеток эмбрионального легкого человека, фибробластов печени шимпанзе, клеток крайней плоти человека, эмбриональных куриных фибробластов, первичных клеток почки обезьяны, ВНК21, клеток HeLa.

Бусы «биосилон» представляют собой микроносители, производимые фирмой Nunc (приложение 3). Это частицы из специально обработанного и стерилизованного облучением пластического материала с диаметром 160—300 мкм. Преимущество

этих бус заключается в неограниченном сроке службы и в отсутствии необходимости набухания перед использованием. 1 кг бус «биосилон» обеспечивает поверхность для культивирования около 25,5 м^2. Эти бусы с плотностью 1,05 г/мл используются таким же образом, как и другие микроносители.

Фирма Bio-Rad Laboratories поставляет бусы «бионосители», созданные на основе поперечно сшитого полиакриламидного матрикса. Эти бусы могут использоваться, как и ранее описанные микроносители, и, кроме того, их можно добавлять в медленно вращающиеся бутыли, где они прикрепляются к стеклу и во много раз увеличивают рабочую поверхность. При встряхивании бусы открепляются и таким образом могут быть легко удалены из бутылей.

Использование микроносителей делает сейчас свои первые шаги, но их применение представляется чрезвычайно перспективным для производства клеток в промышленных масштабах, особенно в области выращивания вирусов и производства клетками различных продуктов, которые могут выделяться из культуральной среды, получаемой простым оседанием бус с клетками.

Глава 4

Подготовка посуды и техника стерилизации

4.1. *Общие замечания*

Клетки в культуре очень капризны. Они не только требуют отсутствия любых токсических веществ в ростовой среде (что может быть достигнуто использованием высококачественной, перегнанной в стеклянной посуде воды), но и скрупулезной подготовки культуральной посуды, с которой контактируют клетки и ростовая среда. Именно по этой причине столь популярна изготовляемая фирмами пластиковая посуда для культивирования клеток. Использование такой посуды позволяет исключить два, часто встречающихся сомнения: 1) достаточно ли чисты используемые для культивирования сосуды и пипетки, 2) хорошо ли они простерилизованы? Вместе с тем постоянное потребление пластиковой посуды разового пользования обходится довольно дорого, и в большинстве лабораторий возникает необходимость повторного использования стеклянной посуды.

После работы всю загрязненную посуду следует замачивать в течение ночи в дезинфицирующем растворе. Чрезвычайно подходит для этой цели 5%-ный раствор хлороса, производимого фирмой ICI Ltd. и поставляемого в 5-галлоновых контейнерах фирмами Durham Chem. Distributors, Birtley, Tyne and Weir или Scottish Agricultural Industries, Renfrew. Хлорос представляет собой водный раствор гипохлорита натрия, и, следовательно, посуда с металлическими крышками и инструменты, которые следует стерилизовать автоклавированием, для него непригодны. Это соединение химически весьма активно, и следует избегать его попадания на одежду или открытые участки тела. Хлорос обладает токсическим действием на любые бактерии, вирусы и остающиеся в посуде клетки и предотвращает высыхание белкового материала, которое могло бы привести к его необратимой фиксации на поверхности стекла.

Обеззараженную посуду погружают в бак с водой. Обычно в лабораториях следует всегда иметь баки с хлоросом и водой, причем их необходимо разгружать раз в день. Хлорос должен еженедельно обновляться, поскольку его эффективность быстро снижается.

После проведения описанной ниже процедуры мытья всю посуду перед высушиванием необходимо ополоснуть деионизованной водой. Деионизация может быть достигнута пропусканием воды через патроны, поставляемые фирмами Elgastat Std.

или Millipore Corp. (приложение 3). Важно поддерживать патроны в хорошем состоянии и ежедневно проверять их эффективность.

4.1.1. Процедура мытья

В практике используются различные процедуры мытья, но существенно избегать применения абразивных и жгучих материалов, таких, как *ВИМ* (Wim) или концентрированные кислоты. Весьма подходящим очищающим агентом является щелочной метасиликат натрия, преимущество которого заключается в следующем. Если на посуде остается слой метасиликата, то при нейтрализации он превращается в стекло. *Кальгон-метасиликат* (КМС) готовят следующим образом. 360 г метасиликата натрия технического фирмы British Drug Houses и 40 г кальгона (водосмягчающее средство; поставляется фирмой R. and J Ltd.) растворяют в 1 галлоне горячей воды. Перед использованием полученную смесь растворяют в воде в соотношении 1 : 100.

Вместо КМС можно использовать детергенты *декон* (Decon) или *7X*. Они поставляются в виде концентрированных растворов и используются более широко, чем КМС. Лишенный фосфата декон 90 должен использоваться в местностях с жесткой водой, а в местностях с мягкой водой можно использовать декон 75. Деконы (поставляемые фирмой Decon Labs Ltd.; приложение 3) используются в виде 2%-ного раствора, а 7X (поставляемый Flow Laboratories; приложение 3) используется в виде 5%-ного раствора. Оба они являются анионными поверхностно-активными соединениями.

4.1.2. Бутыли и пипетки

1. Посуду вынуть из бака, в котором ее замачивали, и из пипеток удалить ватные затычки (следует принять меры предосторожности, чтобы не плеснуть жгучим хлоросом).
2. Поместить посуду в КМС и кипятить в течение 20 мин. Вместо кипячения бутыли можно залить горячими КМС, деконом или 7X и оставить на ночь.
3. Охладить посуду и промыть *шесть* раз проточной водой.
4. Промыть *три* раза деионизованной водой.
5. Сушить в сухожировом шкафу. Белые разводы на поверхности высушенной посуды свидетельствуют о плохом качестве мытья. Эти разводы могут быть результатом плохой промывки или плохого качества деионизованной воды.

4.1.3. *Резиновые пробки*

Природные и силиконовые пробки и крышки следует кипятить в КМС, деконе или 7Х, хорошо промывать проточной водой и кипятить в деионизованной воде в течение 10 мин. После последующей промывки деионизованной водой их следует сушить при комнатной температуре. Металлические крышки не следует обрабатывать КМС, и вместо этого они могут быть прокипячены в 1%-ном растворе бикарбоната.

4.1.4. *Моечные машины*

Если в распоряжении лаборатории имеется моечная машина, то после описанной выше стадии 2 посуду можно для дальнейшего мытья загрузить в машину и затем промыть деионизованной водой. Добавления детергентов на этой стадии, как правило, не требуется, но в случае необходимости можно использовать распыленный декон или 7Х-оматик. Последнее соединение (Flow Laboratories; приложение 3) представляет собой содержащую неионный детергент слабопенящуюся жидкость и используется в форме 1%-ного раствора.

4.2. *Методы стерилизации*

Существуют следующие методы стерилизации: горячий воздух, автоклавирование, фильтрование, облучение (например, γ-облучение кобальтом 60; используется фирмами для пластиковой посуды одноразового пользования), обработка этиленоксидом.

Последние два метода не находят широкого применения в небольших лабораториях, за исключением ртутных ламп низкого давления, излучение которых с длиной волны 254 нм используется для стерилизации воздуха в асептических комнатах и боксах (см. разд. 9.4.1).

4.2.1. *Горячий воздух*

Для стерилизации горячим воздухом стеклянную посуду прогревают при 160 °С в течение 90—120 мин. Этот метод предпочтителен для бутылок с незавертывающимися пробками, когда их горлышко может быть закрыто алюминиевой фольгой. Стерилизация горячим воздухом используется также для чашек Петри и пипеток. Чашки Петри должны быть упакованы в фольгу или специально предназначенный для этого контейнер, либо просто завернуты в *стерилизационную бумагу*. Бесцветные полоски этой бумаги в процессе стерилизации темнеют, что может служить показателем эффективности процесса. Бумага поставляется фирмой 3М Company Ltd. (приложение 3).

Пипетки, снабженные затычками из неадсорбирующей хлопковой ваты, помещают перед стерилизацией в цилиндры из алюминия или стали (поставляются фирмой Gallencamp или A. and J. Beveridge», приложение 3). На дно цилиндров помещают ватную подушку, чтобы не портились кончики пипеток. Эту подушку следует заменять перед каждой стерилизацией пипеток, поскольку длительное нагревание вызывает образование в вате токсичного для клеток углеродистого материала. В центральный цилиндр каждой партии при стерилизации следует помещать стерилизационную ампулу Брауна, тип III (см. ниже).

4.2.2. Автоклавирование

Термостабильные растворы, резиновые пробки, бутыли с пластиковыми крышками, аппараты для ультрафильтрации и т. д. стерилизуются обработкой горячим паром при повышенном давлении. Хотя время, необходимое для стерилизации при давлении в 15 фунтов (~1 атм, или 103,5 кП), не превышает, как правило, 15 мин, продолжительность цикла для современных автоклавов составляет несколько часов. Это обусловлено встроенными в агрегат предохранительными устройствами, не позволяющими открывать крышку, пока температура жидкости внутри бутылей не снизится ниже 80 °C.

Для стерилизации мелких деталей, таких, как резиновые пробки, их следует поместить в стеклянные чашки Петри и завернуть в алюминиевую фольгу.

Пластиковые крышки на пустых бутылях должны быть завернуты не полностью, что обеспечивает проникновение горячего пара внутрь сосудов в ходе стерилизации.

Частично заполненные бутыли должны быть закупорены плотно. Пар, образующийся внутри таких бутылей, эффективно стерилизует их содержимое, но закрытая пробка предотвращает изменение объема жидкости. Именно эти бутыли создают опасность при автоклавировании, если температура и давление окружающей среды резко снижаются. Это может случиться, если преждевременно открыть крышку автоклава, когда бутыли наполнены перегретым паром.

При стерилизации сеточек, применяемых для фильтрования трипсинизированной суспензии при получении первичных культур, сеточки следует поместить в фильтровальные воронки и завернуть воронки в алюминиевую фольгу так, чтобы при разворачивании эта система не нарушилась. Завернутые воронки стерилизуются автоклавированием.

Аппараты для фильтрации (см. ниже) могут быть собраны с установленным фильтром и автоклавироваться как целое.

Важно закупорить входное отверстие хлопковой ватой или прикрыть его крышечкой из алюминиевой фольги.

При стерилизации малого количества материала использование автоклава может быть неоправданным. Вместо него можно употреблять бытовые скороварки, обеспечивающие внутреннее давление до 1 атм, но в этих случаях не следует открывать скороварку, пока она не охладится в достаточной мере.

4.2.3. *Контроль стерилизации*

Стерилизационные ампулы Брауна содержат жидкость, которая под влиянием высокой температуры претерпевает медленное химическое превращение, так что ее цвет меняется с красного на желтый и затем на зеленый. Именно появление зеленого цвета свидетельствует о правильности выбранной комбинации температуры и продолжительности нагреваний. Несколько таких индикаторов должны быть размещены в каждой партии стерилизуемого материала. При автоклавировании жидкостей важно помещать ампулы Брауна в контрольные бутыли с жидкостями, поскольку условия внутри таких бутылей могут отличаться от условий вне их. Для стерилизации сухим жаром и паром используются различные типы ампул Брауна. При стерилизации паром используются ампулы типа 1 (черная метка), а при стерилизации сухим жаром используются ампулы типа III (зеленая метка). Ампулы Брауна поставляются фирмой Albert Browne Ltd. (приложение 3); каждый набор снабжен инструкцией и цветовым кодом.

4.2.4. *Фильтрование*

Мембранные фильтры удаляют из протекающей через них жидкости все частицы, размер которых превышает размер пор. Высокая пористость обеспечивает достаточно высокую скорость протекания, и при правильном подборе размера пор можно получать стерильный фильтрат. Как правило, используются фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, но в некоторых случаях требуются фильтры с порами меньшего диаметра. Поэтому часто используются две или даже три мембраны с уменьшающимся размером пор, например с порами диаметром 0,45, 0,22 и 0,10 мкм. Фильтры изготовляются из этерифицированной целлюлозы, так что их можно стерилизовать автоклавированием. Они устанавливаются в держателе фильтров и в случае необходимости покрываются алюминиевой фольгой. В продаже имеются фильтры с широким диапазоном диаметров, так что фильтрование является рутинным методом стерилизации жидкости в объеме от 1 мл до 5 галлонов и более.

Для фильтрования небольших объемов жидкости мембранные фильтры диаметром 13 или 25 мм вставляются в держате-

ли фильтров из пластика или нержавеющей стали (например, держатели фильтров Swinnex, выпускаемые фирмой Millipore Corp.; приложение 3), которые после автоклавирования соединяются со шприцами, содержащими жидкость, которую нужно простерилизовать. Следует обращать особое внимание на установку мембранных фильтров в держателе, поскольку неправильная сборка приводит к выходу мембраны из уплотняющих прокладок и нарушению процесса фильтрования в целом. Пластиковые держатели имеют ограниченное время эксплуатации, поскольку автоклавирование приводит к искажению их формы. Наиболее надежно, хотя и более дорого, покупать собранные установки с фильтрами на стерилизованных держателях разового пользования (блоки Millex filter, поставляемые фирмой Millipore Corp.; приложение 3).

Для объемов жидкости до 300 мл изготавливаются держатели фильтров из нержавеющей стали (см. ниже). Эти держатели предназначены для установки мембранных фильтров диаметром 47 или 50 мм и снабжены резервуаром для фильтруемой жидкости объемом 100 или 330 мл. Держатель автоклавируют в собранном виде, а выходное отверстие закрывают при этом алюминиевой фольгой. При работе держатель устанавливают вертикально и под выходное отверстие помещают стерильный приемный резервуар. Подлежащая фильтрованию жидкость вводится в резервуар держателя и под принудительным давлением проходит через мембрану. Давление может быть приложено от баллона со сжатым воздухом или с помощью маленького компрессора. При использовании фильтра с диаметром пор 0,22 мкм и давлении 10 фунтов на квадратный дюйм ($\sim$0,7 атм) достигается скорость протока жидкости 140 мл/мин. Для снижения возможности загрязнения в качестве приемного резервуара можно использовать колбу Бюхнера, подсоединенную через неопреновую пробку к выходному отверстию держателя фильтров и имеющую в боковом отводе легкий ватный тампон.

Все устройство для фильтрования может стерилизоваться в собранном виде. При другом способе соединения держателя фильтров с приемным резервуаром выходное отверстие держателя снабжается трубкой со стеклянным колоколом (рис. 4.1).

Объем жидкости, протекающей через такой фильтр, может быть увеличен путем присоединения держателя к питающему сосуду высокого давления. Питающий сосуд объемом до 20 л вставляется между держателем фильтра и источником сжатого воздуха, в результате чего жидкость постоянно подается из большого резервуара в маленький резервуар над мембранным фильтром. Однако фильтры диаметром 47 мм часто забиваются до окончания фильтрования таких больших объемов, так что в этих случаях рекомендуется использовать большие фильтры

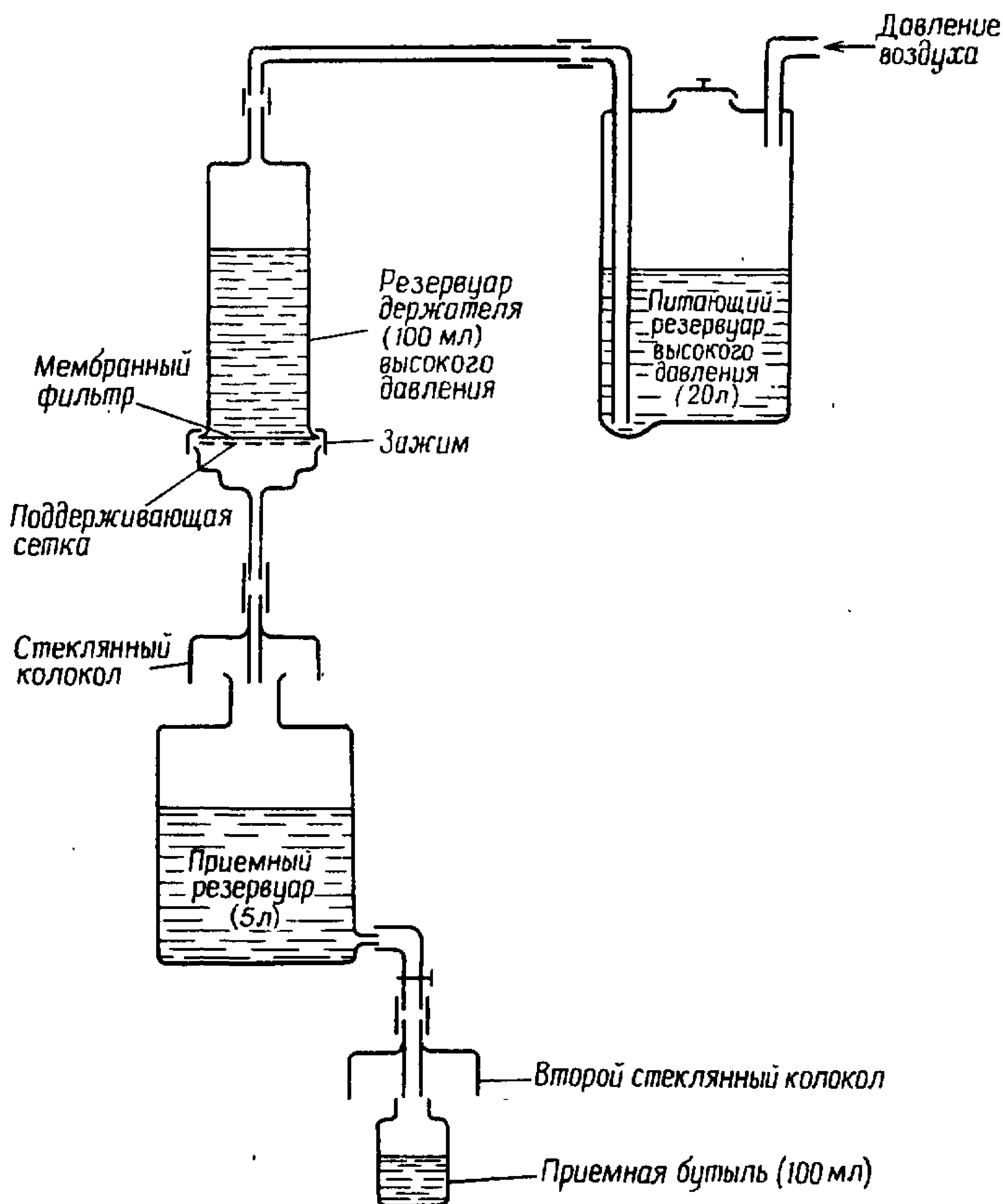


Рис. 4.1. Схема расположения сосудов, используемых при стерилизации фильтрованием. При использовании фильтров большего диаметра, держатели которых лишены собственного резервуара высокого давления, следует использовать питающие резервуары высокого давления. При использовании держателей фильтров с резервуаром на 100 мл и при необходимости фильтрования малого количества жидкости питающий резервуар становится не нужен. В этих случаях фильтрат можно собирать непосредственно в стерилизованную приемную бутыль.

диаметром 142 мм. Держатели для фильтров с диаметром 142 мм лишены собственных надмембранных резервуаров, так что их следует подсоединять к питающим сосудам высокого давления. При давлении 10 фунтов на квадратный дюйм скорость тока жидкости через такой фильтр составляет 1,5 л/мин, и держатель снабжен опорами, позволяющими устанавливать его над сосудами для сбора отфильтрованной жидкости.

Эти держатели фильтров из нержавеющей стали дороги и требуют определенных навыков для правильной сборки. Они также требуют тщательного мытья и стерилизации, и в настоя-

щее время фирма Millipore Corp. (приложение 3) приступила к выпуску нового типа блоков для фильтрования одноразового пользования. Эти фильтрующие блоки «twin 90» имеют ту же поверхность фильтров, что и держатели для фильтров диаметром 142 мм, что достигается благодаря параллельному расположению двух фильтров диаметром 90 мм с размером пор 0,22 мкм в пластиковой оправке. Блоки «twin 90» поставляются стерилизованными и снабжены съемной системой разлива с колоколом. Для проведения фильтрования достаточно подсоединить блок к питающему сосуду высокого давления. Стóят такие блоки довольно дорого, но следует принимать во внимание значительную экономию рабочего времени при использовании блоков «twin 90».

Если в процессе фильтрования возникает необходимость заполнения питающего резервуара высокого давления, то следует внимательно следить, чтобы давление под мембранным фильтром не снижалось, что может привести к загрязнению. Чтобы избежать этого, установка снабжена клапаном перепада давления. Фирма Schleicher and Schuell поставляет системы с ножным управлением, позволяющие останавливать ток жидкости через одинаковые интервалы. Это очень удобно при заполнении 100 миллилитровых бутылей при постоянном токе 10 л стерильной среды. По нашему опыту, такая система слишком громоздка, и мы предпочитаем собирать стерильную среду в большие стерильные приемные резервуары и затем отбирать аликвоты по 100 мл с помощью резиновой трубки или второй системы разлива с колоколом (см. рис. 4.1).

Хотя фирма Millipore Corp. предлагает чрезвычайно широкий выбор держателей фильтров и соответствующих приспособлений, другие фирмы успешно конкурируют с ней. Так, фирма Anderman and Co. Ltd. (приложение 3) является агентом фирмы Schleicher and Schuell, поставляющей фильтры, держатели и тому подобное в сравнимом ассортименте, а фирма V. A. Howe поставляет мембраны Sartorius и держатели фильтров.

Стерилизованные фильтры (0,22 мкм) одноразового пользования для 150 мл среды поставляются фирмой Фалькон (Becton-Dickinson, U. K. Ltd. (приложение 3.) Эти блоки напоминают стерилизованные стаканы, на вершине которых установлен фильтр с резервуаром для фильтруемой жидкости. Вакуумная система подсоединяется к выходному отверстию на стороне приемного сосуда, и, следовательно, фильтрование происходит при отрицательном давлении, что делает такую систему малопригодной для фильтрования белковых растворов. Однако она широко применяется для фильтрования других растворов, и получаемый фильтрат оказывается в транспортируемой форме, мало доступной для загрязнения.

Глава 5

Пересев

5.1. Техника диссоциации

Клетки в ткани и клетки, растущие в монослое на стекле или пластике, прикрепляются друг к другу и к субстрату с помощью мукопротеидов и в некоторых случаях коллагена (разд. 2.3.2). Кроме того, многие клеточные монослои и ткани, особенно эпителиальные ткани, требуют для своей целостности двухвалентных ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}.

По этим причинам для диссоциации тканей и отделения клеток от монослоя используются растворы различных протеаз, иногда в сочетании с хелатирующими агентами.

5.1.1. Трипсин

В течение многих лет для дезагрегации ткани и отделения клеток монослоя от субстрата использовали грубый ацетоновый порошок надпочечника свиньи или крупного рогатого скота. Эти препараты, которые на основе международного стандарта можно называть «трипсин 1 : 250», содержали не только трипсин, но и другие столь же важные ферменты, в том числе химотрипсин и эластазу. Очищенный трипсин редко оказывается столь же эффективен, как исходный неочищенный препарат, особенно при дезагрегации ткани, когда возникают муциновые сгустки (Ronaldoni, 1959).

Следует избегать длительной инкубации с трипсином, поскольку последний оказывает повреждающее действие на клетки. Лучшим способом инактивации трипсина после достижения нужной степени диссоциации является добавление сыворотки (или содержащей сыворотки среды), в которой содержится природный нигибитор трипсина. Для приготовления растворов трипсина используют обычно солевые растворы (ФСБ-А; см. приложение 1), или солевые растворы с цитратом. Применяется обычно 0,25%-ный раствор трипсина.

Для получения 1 л трипсин-цитрата растворяют трипсин (Difco 1 : 250) при интенсивном перемешивании в течение 3—

4 ч в среде следующего состава:

трипсин 1:250	(2,5 г)
тринатрий цитрат	(2,96 г)
хлорид натрия	(6,15 г)
феноловый красный (1%)	(1,5 мл)
дистиллированная вода	(до 1 л)

pH раствора доводят до 7,8 с помощью NaOH (примерно 2 мл 1 н. NaOH) и раствор фильтруют несколько раз через фильтровальную бумагу Ватман № 1. Стерилизацию фильтрованием следует осуществлять с использованием предфильтра и мембранного фильтра с диаметром пор 0,22 мкм.

Этот исходный раствор проверяется на зараженность бактериями и хранится в замороженном виде при —20 °С в емкостях по 20 и 80 мл. Для проверки зараженности используется жидкая среда Сабората (при 31 °С в течение 1 недели; приложение 4) или бульон с экстрактом мозга и сердца (при 37 °С в течение 1 недели; приложение 4). Одна из контрольных культур в каждой серии должна дополнительно содержать сыворотку теленка.

5.1.2. Проназа

Проназа рекомендуется для получения первичных культур, поскольку она обеспечивает лучшее по сравнению с трипсином, образование суспензии одиночных клеток (Gwatkin, 1973). При работе с клеточными линиями проназу следует использовать с осторожностью. Для получения 0,25%-ного раствора 1,25 г проназы (категория В; Calbiochem Corp.) растворяют в 500 мл ФСБ-А при комнатной температуре. Через 30 мин мутный раствор центрифугируют (100 g, 10 мин) и стерилизуют так же, как и раствор трипсина.

5.1.3. Коллагеназа

Согласно имеющимся данным, коллагеназа обладает минимальным повреждающим действием на клетки, в связи с чем она используется для получения клональных клеточных культур (Hilfer, 1973).

Комбинированное использование коллагеназы с гиалуронидазой и затем трипсина или проназы без интенсивного перемешивания (которое приводит к потере клетками жизнеспособности) дает удовлетворительные результаты при получении кле-

ток молочной железы мыши (Prop, Wiepjes, 1973). Известны различные препараты коллагеназы. Фирма Worthington (приложение 3) поставляет четыре типа неочищенной коллагеназы, отобранных по пригодности для получения клеток из различных тканей. Фирма Sigma Chem. Corp. (приложение 3) производит два различных типа для выделения клеток из печени и из жировой ткани.

5.1.4. Версен (ЭДТА)

Обработка хелатирующими агентами, такими, как ЭДТА, приводит к удалению двухвалентных ионов, к диссоциации клеточного монослоя и переходу клеток в суспензию без использования протеаз. Перфузия печени растворами цитрата также часто использовалась в попытках получить первичные культуры клеток печени.

Очень часто, однако, обработка клеток смесью трипсина или трипсин-цитрата с версеном приводит к более быстрому высвобождению клеток из монослоя по сравнению с высвобождением под действием любого из агентов в отдельности. В нашей лаборатории используется следующий способ получения 10 л версена в ФСБ-А:

	10 л
NaCl	80 г
KCl	2,0 г
Na_2HPO_4	11,5 г
KH_2PO_4	2,0 г
Версен (двунатриевая соль диаминотетрауксусной кислоты)	2,0 г
Феноловый красный 1%	15 мл
Дистиллированная вода	до 10 л

Раствор разливают по бутылям емкостью 20, 80 и 160 мл. Автоклавировать при давлении 1 атм в течение 15 мин для бутылей в 20 мл и в течение 20 мин для бутылей в 80 и 160 мл. Хранить при комнатной температуре.

Для приготовления смеси трипсин-версен смешать 1 объем 0,25%-ного трипсина или трипсин-цитрата (см. выше) и 4 объема версена.

5.1.5. Механические методы

Во многих биохимических исследованиях нежелательно отделять клетки от субстрата с использованием трипсина. Это особенно важно в двух следующих случаях.

1. Изучение клеточной поверхности. Трипсин удаляет поверхностные белки клеток, в том числе гликопротеиды и другие антигены, и именно эти изменения ведут, по-видимому, к гибели клеток при длительной обработке трипсином.

2. Исследования, включающие в себя фиксированное время инкубации клеток с ядами, радиоактивными предшественниками, гормонами и т. п. В этих случаях важно собрать клетки как можно быстрее, не инкубируя их при 37°C в измененных условиях в течение неопределенного периода.

Для этих исследований используется механический сбор клеток, т. е. клетки собирают, соскребая их скребком (раббером) или с помощью химических соединений (например, щелочей, кислот, детергентов), которые вызывают немедленную гибель клеток и способствуют быстрому выделению клеточных продуктов.

Рабберы представляют собой резиновые наконечники, выпускаемые фирмой Mac-Farlane Robson Ltd. (приложение 3), которые одеваются на кончик стеклянной палочки и образуют мягкую поверхность, с помощью которой клетки соскребаются с субстрата. Для съема клеток с поверхности чашек используются клинышки из силиконовой резины, вырезаемые из пробки и одевающиеся на кончик инъекционной иглы (рис. 5.1). Преимущество рабберов и клинышков заключается также в легко-

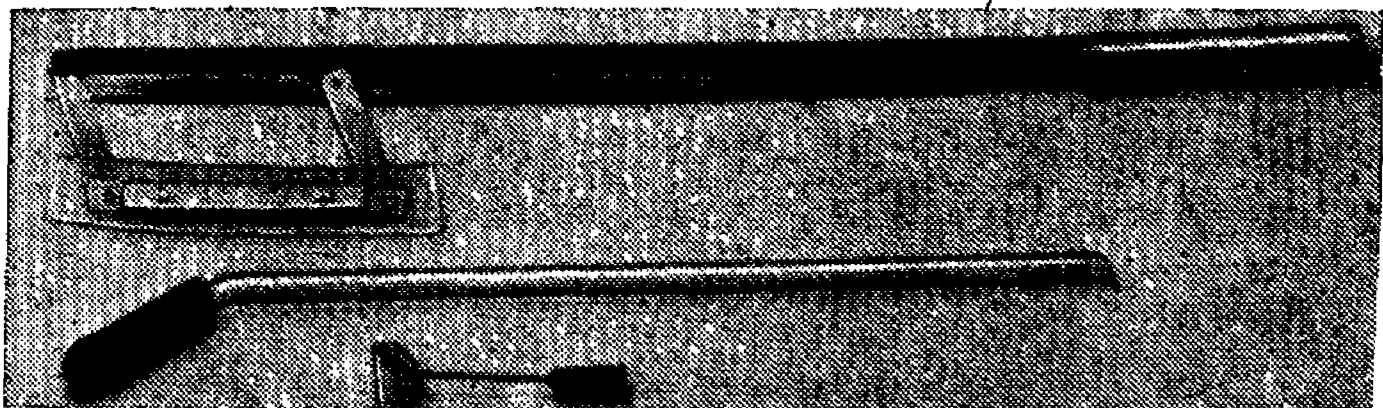


Рис. 5.1. Скребки, используемые для удаления клеток с субстрата. Верхний скребок используется для соскребания клеток с внутренней поверхности вращающихся бутылей. Лопасть складывается вперед, что позволяет скребку проходить через узкое горло бутыли. При достижении дна бутыли лопасть раскрывается, как показано на рисунке, а устройство плеч препятствует дальнейшему раскрытию. В средней части показан раббер, одетый на изогнутую стеклянную палочку. Он используется для соскребания клеток в бутылях меньшего размера. Нижний скребок предназначен для чашек, край обрезанной силиконовой пробки позволяет эффективно соскребать клеткн по краям чашки.

сти их стерилизации автоклавированием. Для соскребания клеток с внутренней поверхности бутылей легко изготовить скребки со складывающейся лопастью.

5.2. Пересев клеточного монослоя

а. Подготовить бутыли и подходящую ростовую среду и прогреть их при 37 °С.
б. К 20 мл версена добавить 5 мл трипсин-цитрата и прогреть при 37 °С.
в. Провести макроскопический и микроскопический анализ монослоя на предмет выявления бактериального заражения.
г. Асептически перелить культуральную среду в универсальную бутыль. Эта среда понадобится для выявления бактериального заражения.
д. Добавить небольшой объем (1 мл для бутылей в 50 мл и 5 мл для бутылей Ру) раствора трипсин-версена при 37 °С.
е. Немедленно слить этот трипсин-версен и добавить новую порцию трипсин-версена при 37 °С.
ж. Закрыть крышкой и инкубировать бутыль при 37 °С. После нескольких минут клетки начинают высвобождаться в суспензию. Для ускорения процесса можно *осторожно* потереть бок бутыли ладонью руки.
з. НЕ ДЕРЖИТЕ КЛЕТКИ В ТРИПСИНЕ ДОЛЬШЕ, ЧЕМ НЕОБХОДИМО, ПОСКОЛЬКУ ЭТО ПРИВЕДЕТ К ПОВРЕЖДЕНИЮ КЛЕТОК.
и. Для предотвращения избыточного действия трипсина добавьте 5—20 мл ростовой среды с сывороткой.
к. Слегка пипетируйте суспензию до исчезновения комков и определите число клеток (см. ниже и разд. 8.2).
л. Перенесите соответствующие объемы клеточной суспензии (см. табл. 3.1) в новые бутыли или чашки и добавьте свежую среду. Обычно клетки делят в соотношении 1 : 4 каждые 2—3 дня, но некоторые штаммы лучше растут при делении в соотношении 1 : 2, а для некоторых линий клеток используется соотношение 1 : 10.
м. Пропустите через бутыли воздух, содержащий 5% CO_2 (разд. 3.1.2) и инкубируйте при 37 °С.

5.2.1. Подсчет живых клеток

В клеточную суспензию добавьте равный объем 0,1%-ного трипанового синего (окрашивает мертвые клетки; приложение 2).

Отберите часть окрашенной суспензии пастеровской пипеткой и заполните счетную камеру гемоцитометра, используя капиллярное всасывание (разд. 8.2.2). Старайтесь не переполнять каналы камер. Сосчитайте клетки под объективом ×10.

Счет клеток проводите в четырех наборах из шестнадцати маленьких квадратов (в каждом углу центральной заштрихованной области; разд. 8.2.1). Считайте только неокрашенные клетки. Разделив полученное число на 4, получите среднее число клеток на 1 мм². Поскольку высота камеры составляет 0,1 мм, то пересчетный коэффициент для гемоцитометра равен 10^4. Предположим, что полученное значение составляет 20 клеток на 1 мм². Тогда $20 \cdot 10^4$ равно числу клеток в 1 мл окрашенной трипсиновым синим суспензии, а $2 \cdot 20 \cdot 10^4$ равно числу клеток в 1 мл исходной суспензии, т. е. концентрация живых клеток в исходной суспензии составляет $4 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл.

5.2.2. *Проверка на бактериальное заражение*

Культуральную среду с этапа *г* процедуры пересева центрифугировать при 800 g в течение 15 мин. Надосадочную фракцию отбросить, а осадок с помощью платиновой петли перенести на косячок с кровяным агаром (приложение 4) и инкубировать при 37 °С в течение по крайней мере двух суток для обнаружения роста бактерий (гл. 9).

5.3. *Цикл роста*

При пересеве клеток в новые сосуды рост клеток с максимальной скоростью возобновляется не сразу, особенно при низкой плотности посева клеток. В течение 1—2 дней после посева клетки находятся в лаг-фазе, в течение которой они адаптируются к новым окружающим условиям и кондиционируют новую среду. Как было показано (Puck, 1972), это не является обязательным свойством растущих клеток. Лаг-фаза может быть практически элиминирована, если избегать избыточной трипсинизации клеток и поддерживать клетки при пересеве при 37 °С. Большинство мышиных клеток L929 начинают делиться в течение суток после пересева более концентрированного инокулята. Тем не менее в течение первых суток после посева часто наблюдается слабое увеличение количества клеток; только через двое суток количество клеток удваивается. После этого экспоненциальный рост может поддерживаться в течение последующих 2—10 суток, если ростовая поверхность сосуда достаточно велика и регулярно производится смена среды. В дальнейшем, однако, скорость роста падает и количество клеток достигает насыщения (рис. 5.2). Некоторые клетки на этой стадии могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких недель, особенно при смене среды каждые 5 дней. В других линиях клеток, растущих в так называемой монослойной культуре, клетки начинают наползать друг на друга, нижележащие клетки оказываются в условиях недостатка питания и вскоре

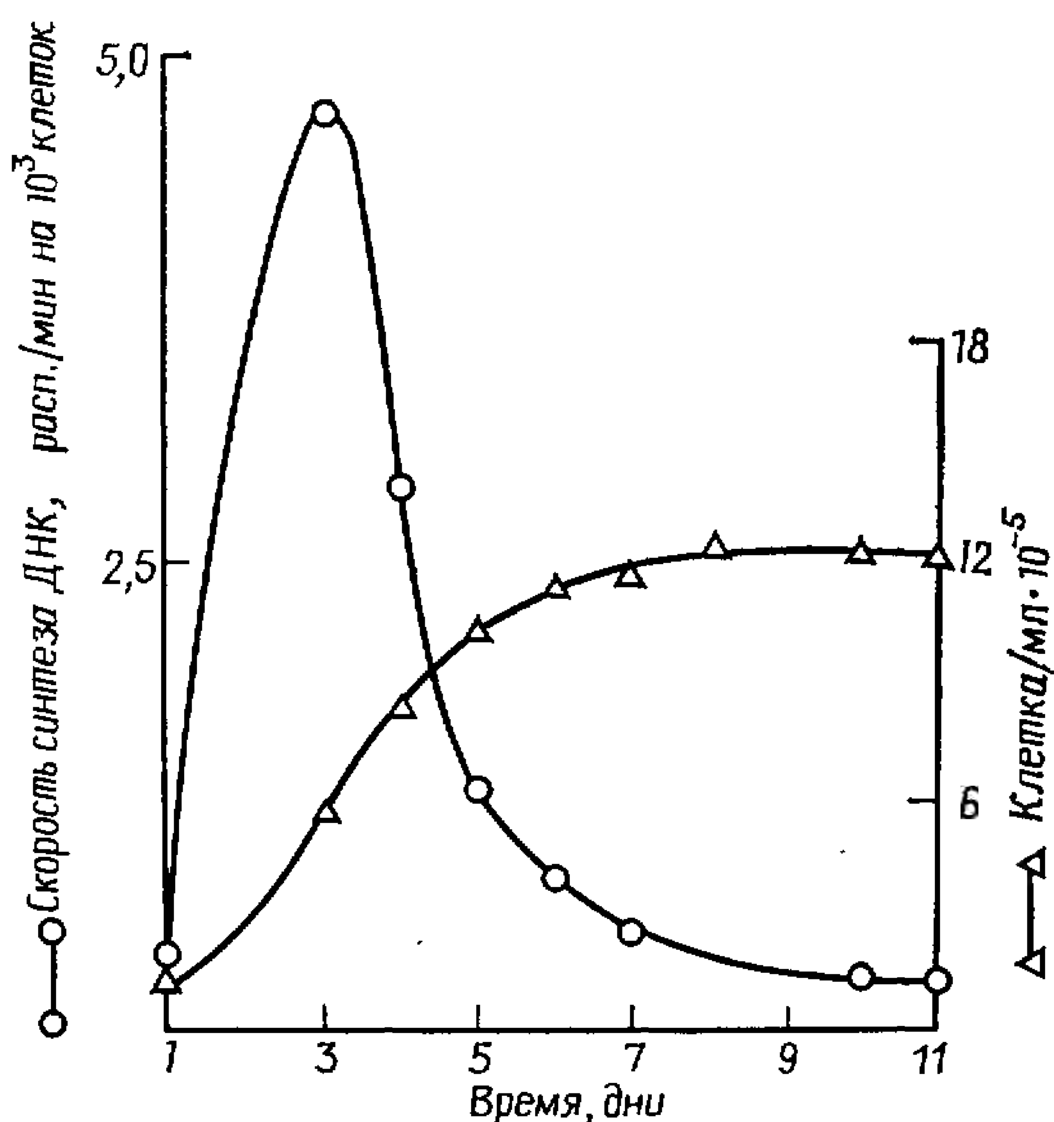


Рис. 5.2. Цикл роста мышиных клеток L929. Мышиные клетки L929 инокулировали в 2-унциевую (~50 мл) медицинскую плоскую бутыль ($5 \cdot 10^5$ клеток в 5 мл минимальной среды Игла с 10% сыворотки теленка). Среду меняли каждые 2 дня. Бутыли инкубировали 60 мин с 2 мкКи 6-^{3}Н-тимидина (80 мкКи/мкмоль) при конечной концентрации тимидина 5мкМ, после чего собирали клетки трипсинизацией и определяли их количество с использованием электронного счетчика. Скорость синтеза ДНК оценивали по включению ^{3}Н-тимидина (гл. 12). (Печатается с разрешения Dr. J. G. Lindsay, 1969).

весь пласт клеток отделяется от стекла. Смена среды в стационарных монослойных культурах препятствует накоплению в культуре кислоты и других продуктов отхода и обеспечивает клетки новыми питательными веществами. В культурах, только что достигших стационарной фазы, смена среды может стимулировать в некоторых клетках дополнительный цикл синтеза ДНК и деления. Это особенно заметно при работе с клетками L929, в которых постоянная смена среды приводит к образованию значительно более плотного монослоя, где все клетки имеют одинаковый маленький размер.

В монослойных культурах нечасто удается получить экспоненциальный рост за период более чем нескольких суток. Посев клеток при сниженной плотности ведет обычно к увеличению продолжительности лаг-фазы, в течение которой происходит несколько делений с увеличенным временем генерации, и все, чего при этом добиваются, сводится к восьмикратному увеличению числа клеток (т. е. трем клеточным делениям) в экспоненциальной фазе роста. Однако, как уже указывалось (Puck,

1972), сообщалось о воспроизводимом экспоненциальном росте одиночных клеток HeLa, который продолжался в течение более чем 10 суток и приводил к 2000-кратному увеличению числа клеток.

В суспензии, однако, клетки могут поддерживать экспоненциальный рост в течение долгого периода и теоретически бесконечно, если их культивировать в хемостате, где увеличение поступления питательных веществ балансируется увеличением оттока клеточной суспензии; это приводит к постоянству окружающих условий и числа клеток. На практике, однако, это трудно достигнуть из-за возможности бактериального заражения. Клетки в суспензии растут обычно в непроточных культурах, которые характеризуются примерно такой же кинетикой роста, как и клетки в монослое.

Глава 6

Первичные клетки

6.1. *Введение*

Первичными клетками называются клетки, полученные от животного и поддерживаемые в культуре вплоть до субкультивирования. Эта глава посвящена описанию методов получения клеток от животных. Что касается человека, то задача получения первичных клеток осложняется необходимостью свести к минимуму наносимый донорам вред. В связи с этим, как правило, используются два типа клеток: лимфоциты и фибробласты кожи. Лимфоциты (обычно неделящиеся клетки) требуют митогенной стимуляции, для чего используются ФГА или другие растительные лектины. Стимулированные лимфоциты претерпевают несколько делений, после чего гибнут. Фибробласты кожи также имеют ограниченный, хотя и более продолжительный период жизни в культуре (Hayflick, 1965a), но их редко удается получить в таком же количестве, как лимфоциты.

6.2. *Лимфоциты*

Лимфоциты могут быть получены от различных видов млекопитающих. Лошади являются идеальным источником лимфоцитов, когда требуется постоянное получение больших партий (200 мл) лимфоцитов от одного донора (Zain et al., 1973). Лимфоциты человека служат идеальным источником ткани человека для изучения генетических заболеваний (Abo-Darub et al., 1978). Использование лимфоцитов свиньи (Forsdyke, 1968) обычно сопровождается забоем животного.

6.2.1. *Выделение лейкоцитов и аутологичной плазмы*

Кровь отбирают асептически в плоскую медицинскую бутыль, содержащую гепарин (2500 МЕ/100 мл крови). «Пуларин», поставляемый фирмой Evans Medical Co. (приложение 3),— подходящий источник гепарина без консерванта. Кровь отстаивают в течение 40 мин при комнатной температуре, и обогащенную лейкоцитами плазму асептически отсасывают и центрифугируют в течение 15 мин при 400 g при комнатной температуре. Надосадочную фракцию отсасывают и центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g при комнатной температуре для

получения бесклеточной аутологичной плазмы, которая хранится при —20°. Осадок клеток суспендируют в 1/10 начального объема аутологичной плазмы.

6.2.2. *Очистка лимфоцитов*

Обычно используются два различных метода: очистка на колонке со стеклянными бусами (Rabinowitz, 1964, 1973) и центрифугирование в градиенте плотности (Boyum, 1968).

6.2.3. *Метод очистки на колонке со стеклянными бусами*

Стерильную колонку с водяной рубашкой (40×2 см) устанавливают в вертикальном положении и через рубашку пропускают воду при 37 °С. Размер колонки должен быть достаточно велик, чтобы обеспечить выделение лейкоцитов из 200 мл крови.

Стеклянные бусы (тип 070-5005), поставляемые фирмой 3M Company, St. Paul, Minnesota, отмачивают в течение ночи в концентрированной HNO_3, затем тщательно промывают проточной и дистиллированной водой, высушивают и стерилизуют при 160° в течение 3 ч. Колонку на 3/4 заполняют стерилизованными бусами и промывают МСИ, насыщенной воздухом с 5% CO_2.

На вершину колонки наносят суспензию лейкоцитов и дают ей медленно протекать. На этой стадии возможны значительные потери, обусловленные прилипанием клеток к стенкам пробирок и пипеток. Чтобы этого избежать, следует использовать силиконизированную посуду (например, обработанную репелкотом (Repelcote; приложение 3). Клетки остаются в колонке при 37 °С в течение 30 мин, после чего их элюируют МСИ, содержащей 50% аутологичной плазмы. Большая часть эритроцитов и лимфоцитов элюируется в первом объеме колонки, и сразу за ними следуют тромбоциты. С колонки размерами 40×2 см собирают обычно первые 40 мл элюата. Гранулоциты и моноциты элюируются только 0,02% ЭДТА в СФБ-А. Плохое разделение клеток может быть обусловлено использованием старой сыворотки или плазмы, так что рекомендуется использовать только свежую аутологичную плазму. При ее недостатке можно использовать более низкие концентрации. Присутствующие в очищенном препарате эритроциты могут быть удалены гипотоническим лизисом, но иногда это приводит к разрушению некоторых лимфоцитов (Dain, Hall, 1967; Roos, Loos, 1970).

6.2.4. Метод градиентного центрифугирования

Триосил (Na-метризоат, или Na-N-метил-3,5-диацетамидо-2,4,4-трииодобензоат) поставляется фирмой Glaxo Laboratories Ltd. (приложение 3) в качестве радиографической контрастирующей среды [60%-ный (вес/объем) раствор содержит 52,2% (вес/объем) Na-метризоата и 2,8% (вес/объем) Ca-метризоата и 2% (вес/ /объем) Mg-метризоата]. Плотность этого раствора 1,39 г/мл; он разводится дистиллированной водой до плотности 1,2 г/мл. Перед использованием 10 частей этого раствора смешивают с 24 частями 9%-ного раствора (вес/объем) фиколла (Pharmacia Chemicals Corp., Uppsala; водный раствор, стерилизованный автоклавированием) для получения «разделяющей жидкости». Быстро готовящаяся смесь «Ficoll-Paque» поставляется фирмой Pharmacia Chemicals (приложение 3).

10 мл суспензии лейкоцитов смешивают с 20 мл 0,9%-ного стерильного раствора NaCl и 28 мл наслаивают на 10,5 мл разделяющей жидкости в стерильных пробирках 14×3 см. Можно использовать меньшее количество клеток, но высота столба жидкости должна быть всегда примерно одинаковой. После центрифугирования при 400 g в течение 25 мин при 20 °С эритроциты переходят в фиколл и осаждаются на дно пробирки, а лимфоциты образуют белый слой на границе между разделяющей жидкостью и солевым раствором. Клетки отсасывают шприцем и дважды промывают ресуспендированием в МСИ (приложение 1), содержащей серин (10 мкг/мл) и глицин (7,5 мкг/мл), после чего центрифугируют при 800 g в течение 10 мин и суспендируют в вышеупомянутой модифицированной МСИ, содержащей 10% аутологичной плазмы. Дифференциальный подсчет белых клеток (Hunter, Bomford, 1968) показывает, что 80—90% выделенных клеток представлены малыми лимфоцитами.

Фирмой Pharmacia (приложение 3) рекомендуется стандартный метод, согласно которому 2 мл цельной, обработанной антикоагулянтом крови смешивают с равным объемом СБСР, наслаивают на 3 мл фиколла Ficoll-Paque) и центрифугируют при 400 g в течение 30 мин. Лимфоциты собирают на границе фаз, а верхний слой используется в качестве источника аутологичной плазмы.

Другой плотной средой для фракционирования клеток крови является «перколл», также поставляемый фирмой Pharmacia (приложение 3). Перколл состоит из частиц коллоидной окиси кремния, покрытых поливинилпиролидоном (Pertoft et al., 1978). Он разводится изотоническим солевым раствором и образует самоустанавливающийся градиент при центрифугировании при 20 000 g в течение 15—20 мин в угловом роторе. На этот градиент наслаивают обработанную антикоагулянтом кровь и

разделяют клетки в два этапа. На первом этапе центрифугируют смесь при 400 g в течение 5 мин и собирают содержащий тромбоциты слой плазмы с верхней части градиента. При последующем центрифугировании при 800 g в течение 15 мин лимфоциты, гранулоциты и эритроциты образуют слои, соответствующие их изопикнической плотности. Клетки собирают путем обратного вытеснения из пробирок с помощью 60%-ной сахарозы и после разведения промывают переосаждением в солевых растворах при 400 g.

6.2.5. *Культивируемые лимфоциты*

Клетки суспендируют (10^6 клетка/мл в МСИ, содержащей серин, глицин, 10% аутологичной сыворотки и пенициллин со стрептомицином 50 МЕ/мл) и вносят в пробирки с крышками размером 12×1,3 см (1 мл), чашки Петри диаметром 6 см (2 мл), пробирки размером 14×3 см (5 мл) или вращающиеся бутыли (50 мл и более). Сосуды либо неплотно прикрывают и инкубируют в CO_2-термостате, либо через них пропускают воздух с 5% CO_2 и плотно закупоривают перед инкубацией.

Для индукции бластогенеза добавляют равный объем среды, содержащей митогены. Наиболее часто используемым митогеном является фитогемагглютинин (ФГА). 100 мг ФГА-М (Difco Lab., приложение 3) растворяют в 5 мл стерильной дистиллированной воды и смешивают в соотношении 1 : 200 с ростовой средой. Митоген коровьего горошка (Gibco Biocult Ltd.) готовится таким же образом, но активный раствор получается при смешивании с ростовой средой в соотношении 1 : 40.

Сразу после добавления митогена клетки начинают слипаться, в связи с чем перед стимуляцией целесообразно разнести клетки по индивидуальным сосудам, так как слипание препятствует воспроизводимому отбору аликвот. В этих условиях синтез ДНК, измеряемый по включению радиоактивного тимидина в материал, нерастворимый в кислоте и этаноле (разд. 12.2), начинается через 24 ч после добавления митогена; в течение последующих 2—3 дней скорость синтеза увеличивается. Мечение ДНК может производиться в течение 6-часового периода с ^{14}C-тимидином (2 мкКи/мл 2-^{14}C-тимидина, 3,7 Ки/моль) или в течение 2-часового периода с ^{3}H-тимидином (6-^{3}H-тимидин, 4 мкМ), после чего клетки осаждают, трижды промывают 5%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ), дважды промывают абсолютным этанолом, высушивают эфиром и после солюбилизации гиамингидроксидом помещают для просчета радиоактивности в сцинтилляционный раствор (толуол/ДФО; см. разд. 12.2.2.2). Чувствительность теста может быть увеличена путем частичной синхронизации синтеза ДНК. Это достигается добавлением в культуру аметоптерина ($5 \cdot 10^{-7}$ М) за несколько часов

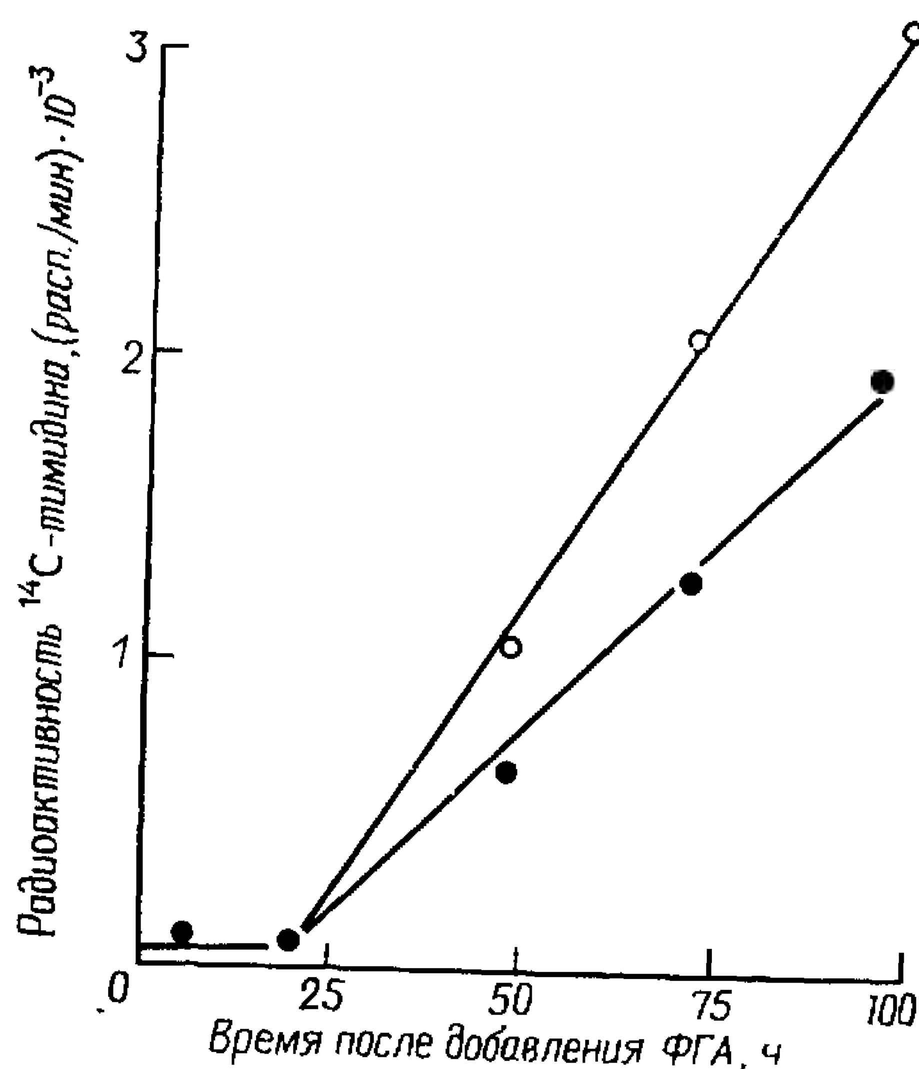


Рис. 6.1. Синтез ДНК в стимулированных ФГА лимфоцитах лошади. Аликвоты лимфоцитов лошади ($3 \cdot 10^6$), очищенных на колонке со стеклянными бусами, инкубировали в течение различного времени с ФГА-М в пробирках в 3 мл МСИ, содержащей серин (10 мкг/мл), глицин (7,5 мг/мл) и 10% аутологичной плазмы лошади. Перед сбором клетки метили 6 ч ^{14}C-тимидином (3,66 Ки/моль 1 мкКи/мл). О — аметоптерин (10^{-6} М) добавлен за 16 ч до сбора клеток; ● — без добавления аметоптерина. По оси ординат отложена радиоактивность ^{14}C-тимидина, включившегося в $3 \cdot 10^6$ клеток. (Печатается с разрешения Dr. B. S. Zain, 1971.)

перед началом инкубации с радиоактивным тимидином и во время инкубации (Tormey, Mueller, 1965; Pegoraro, Benzio, 1971) (рис. 6.1).

6.2.6. Разделение Т- и В-лимфоцитов

Метод, предложенный Хелстромом (Hellström, 1976), основан на избирательной адсорбции обработанных нейраминидазой Т-лимфоцитов человека на иммобилизованном на сефарозе 6 МВ (сверхкрупные гранулы) лектине *Helix pomatia*. Очищенные градиентным центрифугированием лимфоциты (разд. 6.2.4) обрабатывают нейраминидазой из *Clostridium perfringens* (5 мкг/мл, 45 мин, 37 °С) и промывают ФСБ, содержащим сывороточный альбумин человека (0,2%) и азид натрия ($NaNO_2$, 0,02%).

Около 10^8 обработанных лимфоцитов пропускают через 3 мл лектин-сефарозы в маленькой колонке. Через 15 мин несвязавшиеся клетки (главным образом В-лимфоциты — судя по наличию поверхностных иммуноглобулинов и рецепторов для активированных комплементом эритроцитов овцы) элюируются 80 мл ФСБ с сывороточным альбумином человека и NaN_3 (8 мл/мин). Смешанная популяция слабо связывающихся клеток удаляется при пропускании следующих 80 мл ФСБ с альбумином и NaN_3, содержащим 0,1 мг/мл N-ацетил-α-D-галактозамина, а популяция клеток, обогащенная Т-лимфоцитами, элюи-

руется ФСБ-альбумином-NaN_3, содержащим 1 мг/мл N-ацетил-α-D-галактозамина.

Перед использованием клетки следует отмыть от азида натрия.

6.3. Биопсия кожи человека

— Выбрать участок кожи (обычно на внутренней стороне руки), на котором нет волос и который минимально кератинизирован.

— Стерилизовать этот участок 70%-ным этанолом и взять кусочек кожи с помощью хирургических щипцов (корнцанга).

— Острыми ножницами вырезать блок 1 мм³ и поместить его в чашку Петри диаметром 6 см.

— Добавить каплю полной ростовой среды (например, минимальной среды Дюльбеко) с 10% эмбриональной сыворотки теленка и разрезать блок на 5—10 кусочков.

— Распределить несколько кусочков по поверхности чашки и каждый покрыть каплей полной ростовой среды.

— Инкубировать при 37 °C в течение ночи. Иногда чашки при инкубации слегка наклоняют, так что на их краю собирается среда, что обеспечивает высокую влажность и вместе с тем не приводит к отделению фрагментов ткани от поверхности чашки.



Рис. 6.2. **Первичные клетки, разрастающиеся из эксплантата кожи человека.** Через 7 дней после помещения фрагмента кожи человека в культуру обнаруживаются прорастающие из эксплантата фибробласты и эпителиальные клетки. (Печатается с разрешения M. L. Hodgins.)

— Очень осторожно, так чтобы не сместить фрагменты, добавить в чашку 3 мл полной среды и продолжить инкубацию.

Вместо культивирования в чашках Петри фрагменты кожи можно помещать в небольшие бутыли, в которые добавляют 5 мл полной среды таким образом, чтобы при инкубации бутылей фрагменты кожи находились на внутренней поверхности верхней стороны бутылей. Через 16 ч, когда фрагменты кожи прикрепляются достаточно прочно, бутыли осторожно переворачивают, чтобы среда омывала фрагменты.

Рост фибробластов из фрагментов кожи может происходить в течение недели (рис. 6.2).

6.4. *Первичные клетки почки*

Этот метод применим к почкам различных животных в зависимости от необходимого масштаба культивирования.

— Асептически удалить почки. Для этого следует выбрить волосы и протереть кожу 70%-ным этанолом перед лапарэктомией. Хирургические инструменты перед использованием следует окунуть в этанол и обжечь.

— Ополоснуть почки в стерильном ФСБ и перенести в стерильную чашку Петри для рассечения.

— Удалить капсулу. Для этого надо положить почку на бок и разрезать скальпелем на две половины. Капсула у основания не повреждается, и половинки почки могут быть вынуты из нее.

— Используя маленькие ножницы, отделить корковый слой от мозгового и последний выбросить.

— С помощью бритвы измельчить кору.

— Промыть измельченную кору СБСР (приложение 1) и удалить СБСР пастеровской пипеткой.

— Перенести ткань в сосуд с равным объемом 0,25%-ного трипсина в ФСБ-А (приложение 1). В качестве такого сосуда можно использовать сосуды для трипсинизации, поставляемые фирмой Bellco Glass Inc., N.J., или сосуды для гомогенизации Virtis или MSE.

— Перемешивать смесь механически при 37 °C при максимальной скорости, избегая образования пены.

— После 0,5—1 ч дать ткани осесть и декантировать клеточную суспензию. До следующего этапа эта суспензия должна сохраняться во льду.

— Дальнейшие циклы трипсинизации (2—3) проводят до полной дезагрегации ткани.

— Осадить клетки из суспензии центрифугированием при очень малой скорости (50—100 g в течение 20—30 мин).

— Отсосать надосадочную жидкость, используя стерильную пастеровскую пипетку и сосуд для отсоса, подсоединенный к водоструйному насосу.



Рис. 6.3. Фрагменты почечных канальцев кролика. В специальной среде (Lieberman Ove, 1962) эти фрагменты канальцев немедленно прикрепляются к поверхности стекла и рост клеток стимулируется таким образом, что в течение двух дней образуется клеточный монослой. [Перепечатано из статьи Либермана и Ове (Lieberman, Ove, 1962) с любезного разрешения авторов и издателей.]

— Ресуспендировать клетки в прогретой ростовой среде и профильтровать через кисею или марлю. Фильтровальные воронки с кисеей можно завернуть в алюминиевую фольгу или крафт-бумагу и стерилизовать автоклавированием.

— Выход клеток может достигать $\sim 10^8$ клеток на 1 г ткани. Эти клетки следует разводить до концентрации $3 \cdot 10^5$ клетка/мл и распределить по сосудам для роста. Для выращивания первичных клеток почки обезьяны используется среда А Мельника (Melnick, 1955; см. гл. 7). Известен вариант этого метода (Lieberman, Ove, 1962), приводящий к выделению фрагментов почечных канальцев кролика, а не индивидуальных клеток (рис. 6.3). Для их культивирования разработана специальная бессывороточная среда. Через двое суток происходит рост клеток из этих фрагментов канальцев, приводящий к образованию клеточного монослоя. Эта система оказывается очень удобной при изучении биохимических изменений, сопровождающих превращение популяции неделящихся in vivo клеток коркового слоя почек в популяцию делящихся in vitro клеток (Lieberman et al., 1963; Adams et al., 1966; Lee et al., 1970).

6.5. *Культуры мышиных макрофагов (см. Nelson, 1976)*

— Забить мышь (лучше всего 6-недельную) путем смещения шейных позвонков и приколоть к доске.
— Смазать 70%-ным этанолом и удалить кожу с брюшной стенки, не прокалывая брюшную стенку.
— Инъецировать 2,5 мл ростовой среды (МСИ с 10% сыворотки теленка и 10 ед/мл гепарина) с некоторым количеством воздуха в брюшную полость. Не прокалывать кишки. Брюшко мыши вздувается, затягивая место инъекции.
— Массировать брюшную стенку в течение 1 мин для отделения макрофагов в суспензию.
— Используя шприц с иглой 21g×1½ дюйма, отсосать жидкость. Иглу ввести в брюшную полость сбоку и оттянуть в сторону, чтобы избежать забивания кончика иглы.

Подсчитать клетки и распределить их по чашкам (10^6 клеток на чашку диаметром 5 см). Макрофаги прикрепляются в течение 30 мин; сопутствующие лимфоциты и фибробласты могут быть удалены. Перитонеальные макрофаги не растут in vitro без кондиционированной среды (разд. 8.1.1). Из кондиционированной среды был выделен фактор роста макрофагов (Mauel, Defendi, 1971a) и было получено несколько постоянных линий макрофагов (Manuel, Defendi, 1971b).

6.6. *Клетки скелетных мышц крысы или цыпленка*

Должны быть использованы 1—2-дневные крысы, поскольку из более взрослых крыс получаются только фибробласты.

Удалить бедренную мышцу и трипсинизировать ее так же, как и при обработке почки кролика или обезьяны. Конечную клеточную суспензию следует профильтровать через двойной слой стерилизованной ткани для очистки линз, фиксированной в держателе фильтров Swinnex Millipore (разд. 4.2.4), установленном на шприце 20 мл (Yaffe, 1973). Для изучения дифференцировки культуральные сосуды должны быть покрыты коллагеном или желатином. Растворить желатин в горячей дистиллированной воде до концентрации 0,01% и автоклавировать. Поместить 3 мл в чашку Петри диаметром 6 см и оставить на холоду на 2 ч. Удалить раствор желатина и добавить клеточную суспензию в смеси среды 199 (Morgan et al., 1950) и модифицированной Дюльбеко среды Игла (1:4 с 10% сыворотки лошади и 1% экстракта куриных эмбрионов; приложение 1).

При посеве клеток с плотностью $2 \cdot 10^6$—$3{,}5 \cdot 10^6$ клеток на

чашку диаметром 6 см клетки прикрепляются и размножаются в течение 2 дней. Однако после 50 ч начинается период слияния клеток с образованием сети многоядерных волокон и выявляется их поперечная исчерченность.

6.7. Культуры клеток мышиного эмбриона

— Забить беременную мышь (во второй половине беременности) путем смещения шейных позвонков.
— Погрузить мышь в метилированный спирт и облучить ультрафиолетом для стерилизации поверхности тела в течение 5 мин.
— Асептически, используя хирургические щипцы и ножницы, надрезать кожу под передними лапками и оттянуть полоску кожи на задние лапки.
— Стерильными неиспользованными хирургическими щипцами и ножницами вскрыть брюшную полость и перенести матку в большую чашку Петри.
— Каждую матку промыть 25 мл ФСБ-А, содержащим 1% пенициллина и стрептоцина.
— С помощью неиспользованных хирургических щипцов и ножниц извлечь зародышей и поместить их в теплый ФСБ-А. Взболтать и слить ФСБ-А. Промывать до исчезновения мути. Проверять после каждой промывки, используя экстракт сердца и мозга и среду Саборада, возможность бактериального заражения.
— Перенести зародышей в стерильные универсальные бутыли (около шести зародышей на бутыль).
— Измельчить зародышей ножницами и промывать до исчезновения мути. Как и прежде, при каждой промывке проводить контроль бактериального заражения.
— Добавить подогретый 0,25%-ный трипсин в ФСБ-А (около 5 мл на зародыш) в сосуд с волнистым дном емкостью 500 мл и поместить туда стерилизованный магнит, покрытый тефлоном или силиконизированной резиной.
— *Медленно* перемешивать при 37 °С в течение 15 мин.
— Удалить магнитную мешалку и дать ткани осесть.
— Перелить суспензию трипсинизированных клеток (т. е. неосевший материал) в стерильную центрифужную пробирку на 250 мл, содержащую 20 мл сыворотки.
— К тканевому осадку добавить свежий трипсин. Повторить трипсинизацию один или два раза, проверяя каждую суспензию на бактериальное заражение.
— Центрифугировать клеточную суспензию при 150 g в течение 5 мин и отбросить надосадочную жидкость.
— Ресуспендировать клетки в небольшом объеме ФСБ и затем заполнить бутыли ФСБ.

— Дать осесть крупным частицам на дно бутыли. Убрать пипеткой пену и флотировавшие частицы.
— Профильтровать клетки через стерильную газовую ткань для удаления комков.
— Центрифугировать 5 мин при 150 g.
— Посеять в бутыли Ру $40 \cdot 10^6$—$50 \cdot 10^6$ клеток в 50 мл МСИТС (приложение 6).
— Посеять в 80-унциевые бутыли Винчестера $2 \cdot 10^8$ клеток в 200 мл (приложение 6).
— Продуть воздухом с 5% CO_2 (см. разд. 3.1.2) и инкубировать при 37 °С в течение 4—5 дней. После этого проверить на бактериальное заражение.
— Пересевать с отношением пассирования 1 : 2 или 1 : 3.

6.8. *Клетки куриного эмбриона*

— Вынуть яйца из инкубатора после 10-дневного периода инкубации и просветить их, чтобы удостовериться в жизнеспособности зародыша. Можно использовать только хорошо развитых активных зародышей с хорошим кровоснабжением.
— Установить яйца так, чтобы конец с воздушным мешком был сверху и оставить под ультрафиолетом на 10 мин. Протереть яйца 70%-ным спиртом.
— Разбить скорлупу над воздушным мешком и осколки скорлупы удалить стерильным пинцетом.
— Удалить скорлуповую мембрану и хориоаллантоисную мембрану, используя стерильный пинцет.
— С помощью пары изогнутых пинцетов перенести эмбриона за шею в чашку Петри диаметром 90 мм.
— Удалить голову (внутренние органы, например печень, также могут быть удалены и обработаны отдельно; см. ниже) и перенести тушку в коническую колбу (100 мл) с теплой ФСБ-А (приложение 1).
— Для каждого яйца использовать новые ножницы и пинцеты или тщательно стерилизовать инструменты в пламени горелки.
— Прополоскать эмбрионов в ФСБ-А, чтобы отмыть сгустки крови и слить ФСБ-А.
— Как можно тщательнее измельчить эмбрионов ножницами либо в конической колбе, либо в универсальном контейнере. В случае необходимости измельченную ткань можно перенести в сосуд с помощью ФСБ-А.
— Добавить к ткани 0,25%-ный раствор трипсина в ФСБ-А (по 10 мл на зародыш). Внести в сосуд стерилизованный магнитик, покрытый тефлоном или силиконизированной резиной, и перемешивать содержимое с низкой скоростью (1 об/с) на магнитной мешалке в течение 10 мин.

— Дать осесть большим комкам и слить мутную надосадочную фракцию в центрифужный стакан с 20 мл сыворотки теленка. К ткани добавить свежий раствор трипсина.
— Последние две операции повторить один или два раза.
— При трипсинизации небольшого количества эмбрионов диссоциация клеток может проводиться путем легкого встряхивания закупоренного сосуда с измельченной тканью и трипсином в водяной бане при 37 °С в течение 0,5—1 ч.
— Центрифугировать суспензию клеток при 100 g в течение 5 мин и надосадочную фракцию отбросить.
— Ресуспендировать клетки в 20 мл теплой культуральной среды (например, в среде 199 с 2% триптозофосфата и 2% сыворотки теленка). Дать осесть крупным комкам и перенести суспензию клеток в универсальный контейнер.
— Аликвоту клеточной суспензии развести в соотношении 1 : 10 ФСБ-А, содержащем 1% уксусной кислоты и определить число клеток. В хороших условиях из каждого эмбриона можно получить 10^8 клеток.
— Посеять $8 \cdot 10^6$ клеток на чашку Петри диаметром 90 мм. При посеве в бутыли Ру в каждый сосуд вносить по $20 \cdot 10^6$—$30 \cdot 10^6$ клеток. Только половина внесенных в сосуд эмбриональных клеток оказывается способна к прикреплению и дальнейшему росту. При снижении концентрации клеток в суспензии происходит снижение доли способных к прикреплению клеток, особенно если величина инокулята становится меньше 10^6 клеток на чашку диаметром 90 мм (10^5 клетка/мл).
— Инкубировать культуры при 37 °С и на следующий день сменить среду.
— Пересевать между третьим и седьмым днями после посева при отношении пассирования 1 : 4, но чтобы величина инокулята была не ниже 10^5 клеток для чашек диаметром 50 мм или $5 \cdot 10^5$ для чашек диаметром 90 мм.

Клетки куриных эмбрионов редко удается культивировать в течение более чем четырех или пяти пассажей без заметного снижения скорости роста культуры.

6.9. Клетки печени куриных эмбрионов

— Извлечь из яйца эмбрионы, как было описано выше.
— Асептически выделить печень, используя пинцет и большие ножницы, и перенести печень в ФСБ-А в установленной на весах чашке Петри. Повторять операцию, пока не наберется 0,8—1 г ткани.
— Разрезать на маленькие кусочки с помощью пинцета и тонких ножниц.

— Слить среду и добавить 10 мл ФСБ-А с 0,25% трипсина при 37°С. Инкубировать 15 мин при 37°С в термостате, насыщенном парами воды. Для этого поместить в термостат кювету с водой, обеспечивающую высокую влажность и препятствующую испарению воды из чашки с тканью.
— Слить раствор трипсина и промыть дважды свежим ФСБ-А при комнатной температуре в небольшом сосуде.
— Немедленно диссоциировать ткань в небольшом объеме ФСБ-А путем многократного пипетирования. Достаточно 10-кратного пропускания суспензии через Пастеровскую пипетку или иглу шприца.
— Внести концентрированную клеточную суспензию в 10 мл МСИ 10 (приложения 1 и 6) и повторить пипетирование еще 10 раз.
— Дать осесть недиссоциированным фрагментам ткани и удалить их.
— Подсчитать число клеток и с помощью нагретой до 37°С МСИ 10 (приложения 1 и 6) довести концентрацию клеток в суспензии до $3 \cdot 10^6$ клетка/мл.
— Разнести аликвоты клеточной суспензии (5 мл) по чашкам Петри диаметром 5 мм и инкубировать их при 37°С в увлажненном термостате, продуваемом смесью воздуха с CO_2.
— После 1—3 дней культивирования удалить из каждой чашки по 2,5 мл среды и добавить по 2,5 мл свежей МСИ 10 (приложения 1 и 6).

В течение первой недели роста в монослоях этих первичных клеток печени наблюдаются дифференцировочные изменения, характерные для печени цыпленка в период вылупления. Так, удельная активность UDP-гликоуронилтрансферазы в печени цыпленка в день вылупления увеличивается в 10 раз; аналогичные изменения воспроизводятся в монослое эмбриональных клеток печени (Skea, Nemeth, 1969).

6.10. *Культура клеток двукрылых (Dolfini, 1971)*

В 1964 г. были получены изолированные клетки эмбрионов *Drosophyla* (Horikawa, Fox, 1964), размножавшиеся в культуре в течение ряда лет с сохранением диплоидного набора хромосом.
— Удалить хорион из бластодермальных эмбрионов обработкой 3% NaClO в течение 2 мин.
— Стерилизовать 15-минутной обработкой 0,05% $HgCl_2$ в 70%-ном этаноле.
— Диссоциировать развивающиеся яйца мягкой гомогенизацией в стеклянном гомогенизаторе и отфильтровать вител-

линовые мембраны с помощью фильтра с диаметром пор 170—220 мкм.

— Промыть клетки культуральной средой (pH 6,5), содержащей 10% сыворотки новорожденного теленка.

Было получено несколько клеточных линий (Echalier, Ohanessian, 1969), одна из которых характеризовалась следующими параметрами клеточного цикла (Dolfini et al., 1970):

G1 — 1,8 ч
S — 10,0 ч
G2 — 7,2 ч
T — 18,8 ч

где T — общая продолжительность клеточного цикла.

Линии клеток *Aedes aegypti* (Grace, 1960) и *A. albopictus* (Singh, 1967) можно получить следующим образом.

— Стерилизовать яйца, как было указано выше, и дать им развиваться в асептических условиях до стадии выклева.

— Собрать эмбрионов сразу после выклева, обработать 0,25%-ным трипсином при 37 °С в течение 10 минут и диспергировать их пипетированием.

— Промыть клетки и инкубировать их при 28 °С в среде для клеток двукрылых (Mitsuhashi, Maramorosch, 1964) с 10—20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота. В эту среду добавить также заменимые аминокислоты и глутамин. В этой среде клетки *A. olbopictus* удваиваются каждые 10—11 ч и характеризуются следующими параметрами клеточного цикла, вычисленными с помощью метода графического анализа (рис. 10.12):

G1 — 3,0 ч
S — 4,9 ч
G2 — 1,5 ч
M — 1,1 ч

Сходные параметры клеточного цикла обнаруживаются в мозгу *A. aegypti* (Marchi, Rai, 1978).

Глава 7

Среды для культуры клеток

7.1. Введение

Сейчас в редких лабораториях культуральные среды составляются из индивидуальных компонентов в самой лаборатории. Если даже требуется специальная среда, лишенная той или иной аминокислоты, то и такую среду можно найти в каталогах промышленных фирм. Повышенная стоимость таких сред с лихвой перекрывается удобствами, вытекающими из использования стандартных коммерческих сред, для всех исследователей, за исключением тех, которые изучают сами культуральные среды. По этой причине в данной монографии не приводятся детальные методы составления сред из индивидуальных компонентов. Тем, кто интересуется этим вопросом, следует обратиться к соответствующему обзору (Morton, 1970) или оригинальным публикациям. Читателям данной монографии следует лишь иметь в виду, что вода, используемая для приготовления среды, должна быть вначале деионизована (всегда проверяйте эффективность патронов для ионизации — см. разд. 4.1.1) и затем перегнана в стеклянной посуде хотя бы один раз, и после этого она должна храниться в стеклянном или пластиковом контейнере.

В ранних исследованиях поддержание роста клеток обычно обеспечивалось экстрактами эмбриональных и взрослых тканей, но в настоящее время такие экстракты редко добавляются в культуральную среду — и то лишь для культивирования определенных первичных клеток (см. разд. 2.1 и 2.2). Среда, используемая в наше время, помимо аминокислот, витаминов, солей и глюкозы, включает в себя, как правило, сыворотку (до 10%), а в ряде случаев и другие добавки, такие, как бактопептон и триптозофосфат (приложение 1).

Начиная со среды 199 (Morgan et al., 1950), содержащей более 60 синтетических ингредиентов (приложение 1; табл. 18), в свободную продажу стали поступать и культуральные среды другого состава. К сожалению, детали метода составления сред и абсолютные количества индивидуальных ингредиентов у разных фирм, изготавливающих среды, оказываются различными. В упоминавшемся выше обзоре (Morton, 1970) приведены составы и методы приготовления различных сред, находящихся в открытой продаже.

В 1955 г. Игл (Eagle, 1955а) провел качественный и количественный анализ компонентов, обеспечивающих рост нескольких линий клеток млекопитающих. Предложенная им базальная среда (БСИ — приложение 1; табл. 12) содержит 28 ингредиентов и требует добавления 5% сыворотки крупного рогатого скота. Позднее Игл модифицировал эту среду, что позволило избежать ежедневной смены среды для поддержания роста культуры; эта минимальная среда Игла (МСИ) (Eagle, 1959) широко используется до настоящего времени. В ряде исследований были предложены дальнейшие модификации МСИ. Так, МСИ Глазго, содержащая удвоенные по сравнению с БСИ концентрации аминокислот и витаминов и дополнительно глюкозу и бикарбонат, рекомендована для выращивания клеток хомячков ВНК21/С13 (Macpherson, Stoker, 1962). МСИ в модификации Дюльбекко отличается от БСИ в 4 раза более высокой концентрацией аминокислот и витаминов, а также присутствием некоторых заменимых аминокислот и $Fe(NO_3)_3$. Эта среда рекомендована для размножения вируса полиомы в клетках хомячка (Dulbecco, Freeman, 1969) (см. приложение 1; табл. 12).

7.2. *Сбалансированные солевые растворы*

Среды составляются на основе сбалансированных буферных солевых растворов (СБСР), которые, помимо снабжения клеток необходимыми ионами, важны также для поддержания осмотического баланса. В некоторых случаях в сбалансированный раствор солей добавляется глюкоза. Однако лучше добавлять стерильный раствор глюкозы вместе со стерилизованным фильтрованием раствором бикарбоната после того, как остальные ингредиенты будут стерилизованы путем автоклавирования. Состав солевых растворов модифицировался в течение многих лет, и в настоящее время наиболее употребительными оказываются СБСР Эрла, СБСР Хэнкса и специальный СБСР, предложенный Иглом для суспензионных культур. Они поставляются обычно в форме 10-кратных концентратов без бикарбоната на перегнанной в стеклянной посуде воде и могут храниться в холодной комнате с каплей хлороформа на дне для предотвращения бактериального роста (приложение I; табл. 1). Такой исходный раствор разбавляется дистиллированной водой и автоклавируется, после чего в него добавляют бикарбонат и глюкозу. Детали составления СБСР Эрла и Хэнкса приведены в приложении 1 (табл. 1).

Растворы глюкозы и бикарбоната стерилизуются отдельно путем фильтрации, и детали этого процесса приведены в приложении 1 (табл. 3 и 4).

Весьма важно поддерживать правильное значение pH культуральной среды в диапазоне между 7,2 и 7,5, что достигается обычно с помощью системы бикарбонат/CO_2. При концентрации CO_2 в воздухе 5% эта система обеспечивает pH среды 7,4 (при этом pH среда благодря присутствующему в ней феноловому красному окрашена в томатный цвет). При подщелачивании среды ее цвет меняется на красный и далее на пурпурно-коричневый, а при подкислении среды она становится желтой. Поскольку растущие клетки вырабатывают кислоту, в некоторых случаях возникает необходимость увеличения концентрации бикарбоната в среде для обеспечения поддержания надлежащего pH. Фосфаты в СБСР также способствуют поддержанию pH и, кроме того, обеспечивают клетки необходимыми для них ионами фосфата.

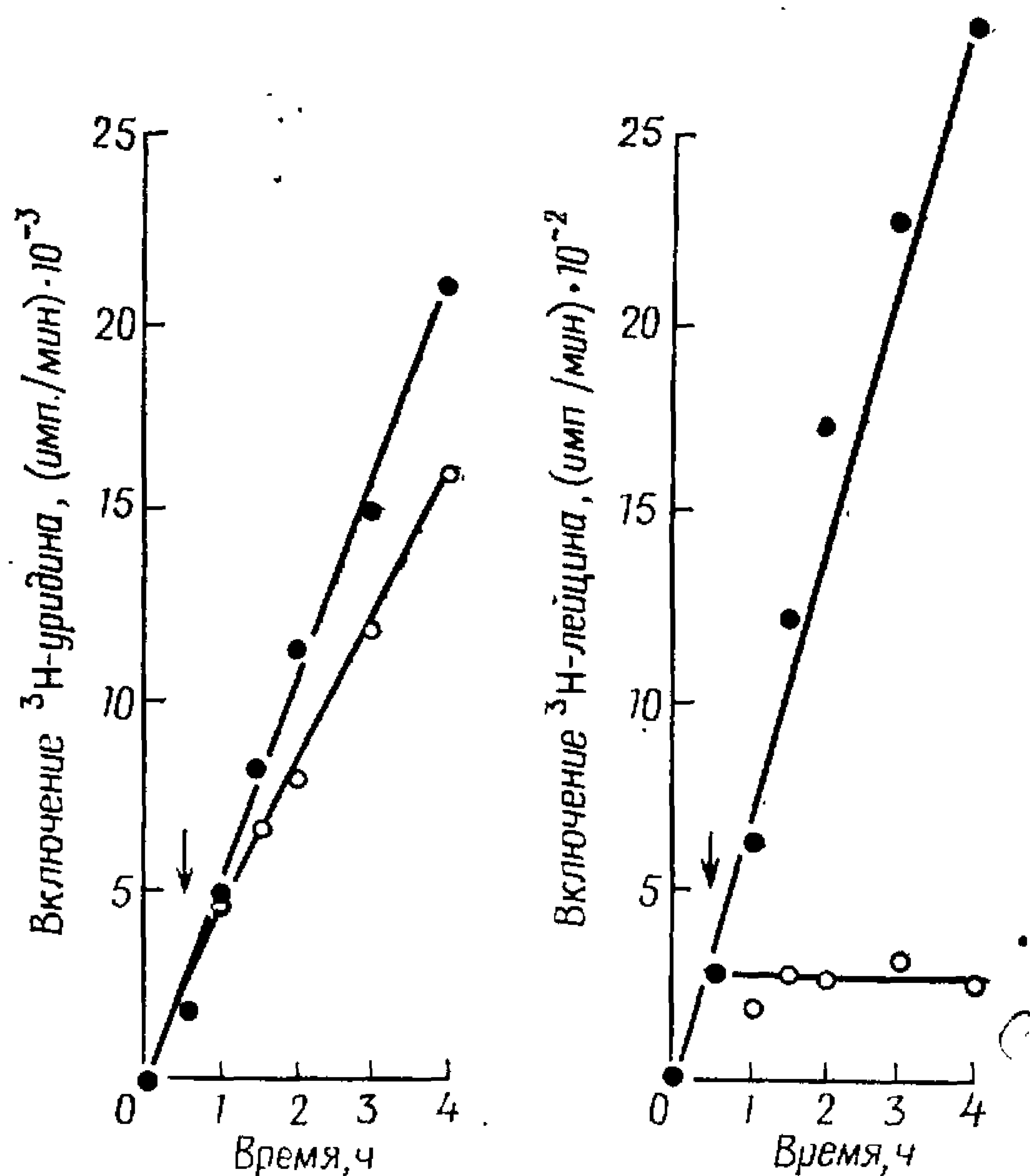


Рис. 7.1. Влияние увеличения концентрации NaCl на включение ^{3}H-уридина и ^{3}H-лейцина в клетки СНО. Клетки хомячка СНО культивировали на покровных стеклах на многолуночных пластинках в среде Игла (модификация Глазго) с 10% сыворотки теленка (10^5 клеток/0,5 мл). После роста в течение ночи в каждую лунку добавляли по 10 мкл ^{3}H-уридина (0,5 мкКи) или ^{3}H-лейцина (2 мкКи) и через 30 мин в половину лунок добавляли 10 мкл 5 М NaCl. В указанное время покровные стекла с клетками вынимали из лунок, дважды промывали холодным СБСР, 4 раза промывали холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой и дважды промывали абсолютным этанолом. Клетки растворяли в 0,5 мл гиамингидроксида и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике в 0,5%-ном растворе дифенилоксазола в толуоле. ● — контроль, т. е. 120 мМ NaCl; ○ — 220 мМ NaCl.

Ионы Na^+ и в меньшей степени K^+, будучи незаменимыми в некоторых внутриклеточных реакциях, имеют важное значение также для поддержания осмотического баланса клеток. Изотоническая концентрация ионов Na^+ в СБСР обеспечивается главным образом NaCl, но в СБСР Эрла источником Na^+ служит также $NaHCO_3$, а в меньшей степени и другие соли (см. приложение I). Увеличение концентрации Na^+ от нормальной (120 мМ) до 220 мМ ведет к диссоциации полирибосом с последующим ингибированием синтеза белка и роста клеток (рис. 7.1) (Saborio et al., 1974).

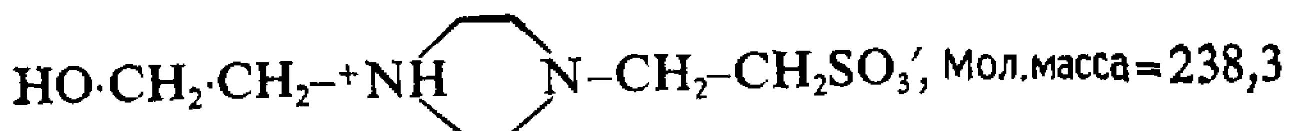
Ионы Ca^{2+} необходимы для прикрепления клеток к стеклянной или пластиковой поверхности и в связи с этим не входят в состав СБСР для суспензионных культур; в таких СБСР концентрация фосфата увеличивается обычно в 10 раз (Eagle, 1959).

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) Дюльбекко сходен с СБСР Хэнкса, но в ФСБ отсутствует бикарбонат, а содержание Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 повышено для обеспечения большей буферной емкости. ФСБ не используется в качестве основы для культуральных сред, но часто применяется для промывки клеточного монослоя. ФСБ составляется из трех частей (приложение 1; табл. 2). Раствор А ФСБ (ФСБ-А) лишен ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, которые добавляются к ФСБ-А в виде отдельных растворов (ФСБ-Б и ФСБ-В) для получения полного ФСБ.

7.2.1. *Цвиттерионные буферы*

Буфер Hepes нетоксичен для клеток и может использоваться вместо бикарбоната; в этом случае отпадает необходимость поддерживать 5%-ную концентрацию CO_2 в газовой фазе культуры. Однако бикарбонат необходим для клонирования клеток (разд. 8.1.1), в связи с чем используется смесь буфера Hepes и бикарбоната, а клетки растут при 2%-ной концентрации CO_2 в воздухе.

Hepes — это сокращенное обозначение 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (мол. масса 238,3).



При 37 °С он характеризуется значениями $pK_{a_2}=3$ и $pK_{a_2}=7{,}31$ и, следовательно, является более удобным буфером, чем бикарбонат, значение pK которого составляет 6,10.

Буфер Hepes используется в концентрации 10—25 мМ и добавляется в среду из концентрата (1 М), приготовление кото-

рого описано в приложении 1 (табл. 5). Помимо буфера Hepes, в средах для клеточных культур используются и другие цвиттерионы. Трицин (N-[(трис-гидроксиметил)метил]глицин, рK_a= =7,79 при 37 °C) использовали в сочетании с МСИ (Spendlove et al., 1971) и со средой Свима 577 (Gardner, 1969), a TES (N[*трис*-гидоксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота, рK_a=7,16 при 37 °C) использовалась в сочетании с МСИ, БСИ и средой 199 (Williamson, Cox, 1968; Massie et al., 1972). Эти буферы используются в различных концентрациях (10—50 м*M*) либо сами по себе, либо (что чаще) в сочетании с бикарбонатом (5—15 мМ). Была предложена комбинация буферов (Eagle, 1971), которая может быть использована для забуферивания среды в диапазоне от 6,4 до 8,35.

7.3. Среда Игла

Эта среда в различных своих формах (БСИ, МСИ; см. приложение 1; табл. 12), как правило, пригодна для культивирования большинства клеточных линий. Для этого в среду следует добавлять 10% сыворотки теленка или сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, а в некоторых случаях триптозофосфат.

Базальная среда Игла (БСИ) требует ежедневной смены для поддержания непрерывного роста культуры, а минимальная среда Игла (МСИ) может поддерживать рост клеток в течение нескольких дней.

Среда Игла, помимо солей и глюкозы СБСР, содержит также 12 незаменимых аминокислот и 9 витаминов. Глутамин и, если необходимо, антибиотики, добавляются вместе с сывороткой перед употреблением.

На практике при культивировании определенных клеток, например клеток обезьян BSC1 и CV1, в МСИ добавляются некоторые заменимые аминокислоты (приложение 1).

В свободной продаже имеются различные формы среды Игла. Так, фирмы Flow Laboratories и Gibco Biocult (приложение 3) поставляют полную неконцентрированную МСИ, которая перед использованием требует лишь добавления глутамина, антибиотиков и сыворотки. Такая форма поставки удобна для проведения редких исследований с культурами в лабораториях, которые не располагают возможностями для собственного изготовления сред. Однако, если потребность в среде превышает 1 л в месяц, то закупка среды Игла в такой форме может оказаться дорогостоящей.

10-кратный концентрат МСИ требует разведения дистиллированной водой и последующего давления глутамина, сыворотки, бикарбоната и, если требуется, антибиотиков.

50- и 100-кратные концентраты витаминов и аминокислот могут быть либо добавлены в соответствующие объемы СБСР с последующим добавлением глутамина и сыворотки, либо смешаны для получения 10-кратного концентрата МСИ (приложение 1; табл. 13 и 14). Как показывает наш опыт, это весьма удобный путь составления среды, поскольку глюкоза и глутамин могут быть добавлены непосредственно в 10-кратный концентрат МСИ. Это значительно дешевле, чем покупать 10-кратный концентрат МСИ. К тому же полуфабрикат занимает значительно меньше места в холодной комнате, чем разведенные сразу до нужной концентрации концентраты аминокислот и витаминов. Методы получения 10-кратных концентратов МСИ и минимальной среды Дюльбекко приведены в приложении 1 (табл. 13 и 14). Эти методы включают в себя фильтрование 10-кратного концентрата среды, но этот этап можно исключить, если раздельно растворять глюкозу и глутамин, стерилизовать их фильтрованием и окончательное составление среды проводить в асептических условиях, используя стерильную дистиллированную воду.

Ростовая среда, т. е. среда, пригодная для продолжительного культивирования установленных клеточных линий, готовится путем разведения 10-кратного концентрата. Если 10-кратный концентрат (сток) уже содержит соли (продажные препараты или полученные при разведении сухой среды — см. ниже), его следует развести водой. Если же концентрат изготовлен по прописям, приведенным в табл. 13 и 14 приложения 1, то его следует разводить СБСР, как указано в табл. 15. В этой таблице приведены методы получения различных минимальных сред, дополненных сывороткой теленка или эмбриона крупного рогатого скота и в одном случае заменимыми аминокислотами. Основой для всех этих сред является МСИ, и различные модификации направлены на улучшение роста указанных в таблице определенных линий или штаммов клеток.

7.3.1. Сухие среды

Недавно в продаже появились сухие среды, изготавливаемые, например, фирмами Flow Laboratories и Gibco Biocult Laboratories (приложение 3). При большом расходовании сред закупка сухих сред оказывается наиболее дешевой. Сухие среды занимают мало места и могут храниться в холодной комнате в запаянных контейнерах в течение 6—12 мес. Согласно инструкции фирм-изготовителей, сухую среду следует разводить до конечной концентрации при комнатной температуре. Важно не оставлять даже следов порошка нерастворенными. Бикарбонат добавляют отдельно и pH среды доводят до 7,1 перед стерилизацией фильтрованием. Перед использованием в среду следует

добавить глутамин (если он там уже не присутствует) и сыворотку (обычно до 10%, как описано в приложении 1).

Каждую партию растворенной среды следует проверить на бактериальное загрязнение в а) жидкой среде Сабората при 31 °С в течение 1 недели (приложение 4) и б) в бульоне с экстрактом мозга и сердца при 37 °С в течение 1 недели (приложение 4).

Автоклавируемую сухую среду, в которой фосфатный буфер заменен на сукцинатный (Yamane et al., 1968), следует растворить в дистиллированной воде (95% от конечного объема), а pH раствора необходимо довести до 4,1 перед 15-минутным автоклавированием при 121°. После охлаждения добавить стерильный 7,5%-ный раствор $NaHCO_3$ (3 мл на 95 мл среды) вместе с глутамином, сывороткой и т. д. и в случае необходимости довести pH до 7,2—7,4 с помощью стерильного 1 н. NaOH.

Мы обнаружили, что вопреки рекомендациям фирмы-производителя и при тщательном растворении всего порошка из сухой среды МСИ Глазго можно получить 10-кратный концентрат, который перед использованием требует только разведения стерильной дистиллированной водой и доведения pH. В этом случае важно не доводить pH бикарбонатом до конечного разведения среды.

Получение 10-кратных концентратов обладает следующими преимуществами: 1) меньший объем жидкости требует стерилизации фильтрованием; 2) 10-кратный концентрат занимает меньше места в холодной комнате; 3) экономически более выгодно покупать порции сухой среды, обеспечивающие получение 5 л 10-кратного концентрата (50 л готовой среды), чем меньшие количества сухой среды.

7.4. *Более усложненные среды*

Для отдельных линий клеток разработаны специальные среды, обеспечивающие оптимальный рост этих линий или возможность их культивирования в бессывороточной среде. Так, среда Мак-Коя 5А (McCoy et al., 1959) используется как стандартная среда для клонирования клеток. Она основана на СБСР и аминокислотах и витаминах из среды 199 (приложение 1; табл. 18). В дальнейшем среда Мак-Коя была модифицирована в среду RPMI-1629, пригодную для длительного культивирования лейкозных миобластов (Armstrong, 1966) (приложение 1; табл. 17).

Среда Хэма F10 была тщательно подобрана по составу для клонирования диплоидных клеток яичников хомячка (Ham, 1963). Более поздняя модификация этой среды, среда Хэма F12 (приложение 1; табл. 16; Ham, 1965), была предназначена для

поддержания роста клеток в присутствии минимальных количеств сыворотки.

Среда медицинской исследовательской лаборатории в Коннауте CMRL также была предназначена для поддержания роста клеток в отсутствие сыворотки. Среда CMRL 1066 (приложение 1; табл. 20) способна к поддержанию роста нескольких клеточных линий, так же как и среда NCTC 135 Национального института по изучению рака (приложение 1; табл. 19). Рост клеточных культур в отсутствие сыворотки обеспечивается также средой CMRL 1415 (Healy, Parker, 1966a, b; Evans et al., 1964).

Многие из этих более сложных сред поставляются фирмами, например Flow Laboratories или Gibco Biocult (см. приложение 3) в готовой для использования концентрации; состав некоторых из этих сред приведен в приложении 1.

7.5. Простые среды с неидентифицированными добавками

В продаже имеется значительное количество сред, состав которых подобран не в результате детальных исследований ростовых потребностей клеток, а в результате попыток найти недорогой источник аминокислот и витаминов, такой, как гидролизат лактальбумина (приложение 1; табл. 9) или дрожжевой экстракт (приложение 4). Так, среды Мельника А и Б для клеток почки обезьяны (Melnick, 1955) содержат гидролизат лактальбумина и сыворотку теленка в СБСР Хэнкса и Эрла соответственно. Среда для клеток комаров (Mitsuhashi, Maramorosch, 1964; Singh, 1967) включает в себя гидролизат лактальбумина, дрожжевой экстракт, сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота и специально подобранный солевой раствор.

7.6. Антибиотики

Метод получения концентратов антибиотиков для введения в культуральные среды изложен в приложении 1 (табл. 6). Пенициллин в концентрации 0,2—1,5 ед./мл подавляет рост большинства грамположительных бактерий. Стрептомицинсульфат при концентрации 100 мкг/мл эффективно подавляет рост грамотрицательных бактерий, но его время полужизни в физиологических условиях составляет только 4 дня. Можно использовать более стабильный дигидрострептомицин. Ваномицин в концентрации 100 мкг/мл активен не только против грамотрицательных бактерий, но и против микоплазмы и может быть использован для освобождения культур от микоплазмы (гл. 9).

Использование антибиотиков при культивировании клеток целесообразно только в случае кратковременных культур, а

постоянное пассирование клеточных линий должно проводиться в отсутствие антибиотиков, чтобы не опасаться отбора устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Более подробные сведения об антибиотиках можно найти в гл. 9.

7.7. Сыворотка

Известны многочисленные попытки вырастить клетки в полностью синтетической среде, но подавляющее большинство клеток способно к пролиферации только в среде с различными природными добавками, обычно сывороткой. В продаже имеются различные препараты сыворотки, но большая часть клеток лучше всего растет в присутствии сыворотки крупного рогатого скота. Эта сыворотка получается либо от эмбрионов, либо от новорожденных телят. Получение сыворотки (особенно от эмбрионов), ее обработка и стерилизация представляют собой довольно сложные операции, требующие специальной аппаратуры, так что лучше получать сыворотку от фирм-производителей, таких, как Flow Laboratories и Gibco Biocult (см. приложение 3).

При получении препаратов сыворотки требуется сводить гемолиз к минимуму и проводить обработку только подходящих партий сыворотки. Обработка включает в себя пропускание сыворотки через серию фильтров с диаметром пор до 0,1 мкм, после чего проводятся различные тесты на выявление возможных загрязнений бактериями, микоплазмой и вирусами. Кроме того, для каждой партии сыворотки следует определять ее способность поддерживать рост первичных культур, а также диплоидных и установившихся линий клеток, используя как тест на серийное пассирование, так и тест на эффективность посева.

Перед покупкой сыворотки следует получить образцы различных партий и повторить тест на эффективность посева (разд. 8.12) или определить скорость роста и выход клеток по крайней мере для двух клеточных линий. При этом важно оценивать пригодность образцов сыворотки непосредственно в лаборатории, которая закупает сыворотку. Большинство фирм-изготовителей охотно идет на такую проверку и хранит у себя образцы каждой партии сыворотки при —20 °С, ежемесячно представляя их на проверку. После приготовления сыворотку следует хранить при —20 °С. При этой температуре сыворотка сохраняется в течение 6 и более месяцев. Сыворотку следует медленно оттаивать при 4 °С и не допускать повторных циклов замораживания и оттаивания.

7.7.1. Удаление из сыворотки маленьких молекул

Это необходимо при изучении питательных потребностей клеток, а также в случае мечения клеток определенными радиоизотопами; в последнем случае удаление из сыворотки маленьких

Таблица 7.1

Материал, удаляемый из сыворотки гель-фильтрацией или диализом

Компонент	Цельная сыворотка	После гель-фильтрации	После диализа
Аланин (мМ)	0,672	0	<0,001
Аргинин (мМ)	0,246	<0,001	0
Аспартат (мМ)	0,146	<0,001	<0,001
Глицин (мМ)	0,408	<0,001	<0,001
Глутамат (мМ)	0,309	0	<0,001
Гистидин (мМ)	0,216	<0,001	<0,001
Изолейцин (мМ)	0,121	<0,001	0
Лейцин (мМ)	0,347	0	0
Лизин (мМ)	0,129	0	<0,001
Метионин (мМ)	0,015	0	0,005
Фенилаланин (мМ)	0,126	0	0,001
Пролин (мМ)	0,387	<0,001	0
Серин (мМ)	0,295	<0,001	<0,001
Треонин (мМ)	0,261	<0,001	<0,001
Тирозин (мМ)	0,498	0	0
Валин (мМ)	0,336	0	0
Общий белок (г%)	7,3	6,2	6,5
Холестерин (мг%)	135	113	122
Мочевая кислота (мг%)	1,4	0,8	0,7
Глюкоза (мг%)	132	6	7
Калий (мэкв/л)	5,8	0	0
Кальций (мг%)	7,2	2,8	0,2
Щелочная фосфатаза (ед.)	15,9	13,2	14,0

молекул позволяет правильно оценить удельную радиоактивность предшественников и обеспечивает их максимально высокую удельную радиоактивность. Так, скорость синтеза белка в клетках оценивается, как правило, по включению в клеточные белки экзогенной тритированной аминокислоты. В этом случае используется специальная среда, лишенная этой аминокислоты. Сыворотка, однако, может содержать значительное количество этой аминокислоты, в связи с чем для увеличения радиоактивной аминокислоты сыворотка должна быть предварительно освобождена от свободных аминокислот. Это достигается двумя методами.

1. *Обработка сефадексом.* Стерильная колонка (2,5×100 см), содержащая 50 г грубого сефадекса G-50, промывается 5 л стерильного 0,85%-ного солевого раствора. Суспензия сефадекса может быть стерилизована автоклавированием при 121 °C в течение 15 мин перед набивкой колонки. На колонку наносят 200 мл цельной сыворотки и элюируют солевым раствором со скоростью 4—5 мл/мин. Свободный объем колонки элюируется между 200 и 400 мл.

2. *Диализ.* Диализные мешки стерилизуют кипячением в дистиллированной воде и в асептических условиях заполняют сывороткой. Диализ проводят против двух смен 100-кратного объема стерильного физиологического раствора или СБСР при 4 °C в течение 48 ч. В конце этого периода времени сыворотку удаляют из диализного мешка в асептических условиях. В табл. 7.1 приведен состав сыворотки до и после обработки (Patterson, Maxwell, 1973).

Хранение сыворотки при 37 °C в течение трех недель приводит только к ограниченному протеолизу, но не рекомендуется оставлять сыворотку в этих условиях в течение длительного времени, поскольку это может привести к повторному появлению маленьких молекул.

7.7.2. *Роль сыворотки*

В недавно опубликованной работе (Ham, McKeehan, 1978) приведены результаты попыток выращивания диплоидных клеток в бессывороточной среде. В этих исследованиях подчеркивается важность точного поддержания концентрации питательных веществ и природы поверхности культурального сосуда для обеспечения клонального роста клеток. Авторам удалось снизить концентрации диализованной сыворотки в культуре до 500 мкг белка на 1 мл среды.

Хотя из сыворотки выделен ряд факторов, необходимых для поддержания клеточного роста, вопрос о количестве и природе этих факторов до настоящего времени остается нерешенным. Можно думать, например, что для поддержания роста клеток необходимы гормоны, связанные с белками сыворотки (Lefferi et al., 1977; Hayashi et al., 1978). Недавно удалось заменить сыворотку пятью гормонами (трииодтиронин, тиреолиберин, трансферрин, соматомедин и биологически активный пептид паратгормона) для поддержания эквивалентной скорости роста культуры клеток GH_3 (линия клеток гипофиза крысы, продуцирующих СТГ и пролактин) в среде Хэма F-12 (Hayashi, Sato, 1976). Смесь 25 гормонов может заменить сыворотку в поддержании роста клеток ВНК и HeLa, но не все из этих гормонов являются необходимыми.

Факторы роста фибробластов и факторы, получаемые из тромбоцитов, представляют собой полипептиды, выделяемые из сыворотки и кондиционированной среды (Burk, 1976; Antionades, Scher, 1977; Ross, Vogel, 1978). Эти факторы могут играть первостепенную роль в поддержании роста культур фибробластов и глиальных клеток (Westermark, Wasteson, 1976; Rutherford, Ross, 1976; Vogel et al., 1978). Было показано (Westall et al., 1978), что выделяющийся из миелина основной белок расщепляется с образованием двух факторов роста фибробластов меньшего размера. Факторы роста нервов принимают участие в организации актина и активации аденозинтрифосфатаз (Calissano et al., 1978), причем медиатором действия этих факторов является, по-видимому, циклический AMP (Ralf et al., 1978; Green, 1978). С другой стороны, имеются данные об активирующем действии фактора роста фибробластов на гуанилатциклазу (Rudland et al., 1974), и в трансформированных SV40 клетках 3T3 содержание циклического GMP оказывается выше, чем в нетрансформированных клетках (Moenz et al., 1975). В недавно вышедшем обзоре обсуждается роль циклических нуклеотидов в контроле роста клеток (Miller et al., 1975).

Были выделены также эпидермальные ростовые факторы (ЭРФ) (Richman et al., 1976), а также активности, стимулирующие пролиферацию (Bolen, Smith, 1977). ЭРФ и инсулин связываются с клеточными мембранами, образуя рецепторные комплексы, которые затем захватываются клетками и транслоцируются в околоядерные участки клеток (Das, Fox, 1978; Haigler et al., 1978; Schlessinger et al., 1978). Мембранные белки комплексов включают гликопротеиды (Maturo, Hollenberg, 1978; Sahyoun et al., 1978), а действие ЭРФ может заключаться, в частности, в усилении их фосфорилирования (Carpenter et al., 1978). Интернализация флуоресцентно меченного ЭРФ экспериментально доказана (Haigler et al., 1978), но этот процесс может быть несуществен для проявления действия ЭРФ, поскольку ЭРФ, прочно связанные с компонентами клеточной поверхности, обнаруживаются даже через 8 ч после 30-минутного контакта клеток с ЭРФ (Schechter et al., 1978). Если в это время обработать клетки специфическими к ЭРФ антителами, то биологическое действие ЭРФ, выражающееся в стимуляции синтеза ДНК и клеточных делений, подавляется.

В клеточной мембране идентифицирован белок с мол. массой 185 000, с которым связывается ЭРФ (Baker et al., 1979; Linsley et al., 1979). Существует точка зрения о том, что митогенное действие тромбина на неделящиеся клетки куриных и мышиных эмбрионов и клеток крайней плоти человека в среде без сыворотки обусловлено связыванием тромбина с белком клеточной поверхности с мол. массой 43 000 и последующим

расщеплением этого рецепторного белка (Glenn, Cunningham, 1979). Следует отметить также существование реципрокных соотношений между пролиферацией и дифференцировкой. В культуре клеток коры надпочечника стимулирующий стероидогенез АКТГ подавляет пролиферацию клеток, а ФРФ оказывает противоположное действие (Gill et al., 1978).

7.8. Другие природные добавки

Для преодоления неидентифицированных ограничений роста клеток и промотирования роста культуры в культуральную среду часто добавляют неочищенную смесь питательных веществ. В приложении 1 (табл. 9, 10 и 11) приведены методы получения гидролизата лактальбумина, экстракта куриных эмбрионов и триптозофосфатного бульона, а в соответствующих главах этого издания встречаются указания на использование этих компонентов.

7.9. Среды для культивирования клеток насекомых

Целью создания культуральной среды является имитация в какой-то мере состава жидкости, окружающей клетки in vivo. Это создавало трудности для культивирования клеток насекомых в 30-х годах, поскольку состав гемолимфы был неизвестен. Но, впоследствии оказалось, что это не столь существенно (Yunker et al., 1967; Vaughan, 1971). Таким образом, хотя концентрация неорганических солей в культуральной среде для клеток насекомых и соответствовала составу гемолимфы, аминокислоты и витамины этой среды обеспечивались гидролизатом лактальбумина, ультрафильтратом цельных яиц и сывороткой крупного рогатого скота, когда в распоряжении исследователей не было гемолимфы. Наиболее эффективной из многих исследованных сывороток оказалась сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (Mitsuhashi, Maramorosch, 1964; Singh, 1967). Высокая концентрация аминокислот, обнаруженная в гемолимфе, имитировалась добавлением 10%-ного гидролизата лактальбумина в сочетании с заменимыми аминокислотами. Ряд исследований был посвящен изучению потребности культивируемых клеток насекомых в аминокислотах. Была показана зависимость некоторых культур от добавления в среду аминокислот (Grace, 1962). Однако наличие в средах природных добавок, таких, как ультрафильтрат цельных яиц, ставит под сомнение значимость результатов, указывающих на зависимость роста клеток от концентрации специфических аминокислот.

Наиболее распространенным энергетическим источником в культурах клеток насекомых является глюкоза, хотя в гемо-

лимфе насекомых встречается большое количество других углеводов (Wyatt, Kalf, 1957). Незаменимыми для культивируемых клеток насекомых оказались витамин В и аскорбиновая кислота (Samborn, Haskell, 1961).

Состав неорганических солей в средах различных культур клеток насекомых варьирует в широких пределах. pH среды поддерживается, как правило, ниже 7,0, но и эти условия не всегда бывают оптимальными, и клетки *Aedes albopticus*, в частности, культивируются при pH 7,2.

Глава 8

Методы

8.1. Клонирование клеток и эффективность посева

Неумение подобрать правильный состав первых культуральных сред привело к тому, что первое успешное клонирование соматических клеток было достигнуто только в 1948 г. (Sandford et al., 1948).

Проблемы, возникающие при клонировании, обусловлены необходимостью выращивать клетки в очень сильном разведении. При этом среда должна служить источником питательных веществ, которые могут образоваться в качестве продуктов метаболизма клеток, но теряются клетками раньше, чем они смогут быть использованы в последующих биосинтетических реакциях. Растущие в культуре клетки постоянно выделяют в среду питательные вещества, потребляя из среды необходимые для роста питательные вещества. Для клеток, растущих в концентрации 10^5—10^6 клетка/мл, среда быстро становится *кондиционированной*. Это означает, что среда с этого времени содержит в себе ряд компонентов, выделяемых в нее растущими клетками. Такими компонентами могут быть свободные аминокислоты, например глицин, не входящий обычно в состав простых питательных сред (разд. 2.2) или более сложные ростовые факторы (разд. 7.7.2). Однако если концентрация клеток снижается до 1—2 клеток на 1 мл, то выход из клеток того или иного компонента, например глицина, не балансируется эквивалентным захватом этого компонента, и клетки погибают от истощения. Среди компонентов среды, необходимых для роста клеток при низкой плотности, оказываются пируват, заменимые аминокислоты и двуокись углерода (Eagle, 1971). В связи с этим важно проводить клонирование в среде с буфером бикарбонат/CO_2, а при использовании органических буферов, таких, как Hepes, следует добавлять в среду бикарбонат и CO_2 (например, 20—25 мМ Hepes в сочетании с 8 мМ бикарбонатом и 2% CO_2 в газовой фазе). Известны два подхода к решению проблем, возникающих при клонировании клеток. Клетки можно клонировать либо в ограниченной микросреде, например в капиллярных трубках, что позволяет им быстро кондиционировать среду, либо в присутствии большого количества погибших клеток, например на фидерном монослое клеток, облученных рентгеновскими лучами (Puck et al., 1956; Sandford et al., 1961). Для клониро-

вания клеток специально разработана среда Хэма F12 (Ham, 1965), в которую следует добавлять 10—30% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота. Необходимо принимать меры для предотвращения защелачивания среды в результате потери CO_2.

Для клонирования постоянных линий клеток применения этих методов, как правило, не требуется. Так, разведенная суспензия клеток HeLa (примерно 100 клеток в 5 мл) может быть использована для получения колоний, возникающих из единичных клеток. Важно лишь предотвратить передвижение этих клеток (приводящее к смешиванию клонов), для чего клетки иногда покрывают мягким агаром.

Клоны можно изолировать, либо заключив каждую колонию в цилиндр из нержавеющей стали с последующим снятием клеток трипсином, либо вначале засеяв клетками чашки с многочисленными кусочками покровных стекол и отобрав затем те кусочки покровных стекол, на которых находится по одному клону.

Для измерения эффективности посева используют такие же процедуры. Образующиеся колонии фиксируют, окрашивают по Гимза и сравнивается число колоний с величиной инокулята, использованного при посеве. У первичных клеток эффективность посева, как правило, низка, но у клеточных линий эффективность посева может достигать 100%.

8.1.1. *Простые методы клонирования или определения эффективности посева*

— Промыть монослой клеток СБСР для удаления сыворотки.
— Снять клетки с подложки 0,25%-ным трипсином в СБСР или ФСБ (двухвалентные ионы улучшают эффективность посева) и диспергировать их мягким и кратковременным пипетированием. Трипсинизация при 4 °С в течение 2—10 мин особенно рекомендуется в случаях клонирования клеток при низкой концентрации сыворотки.
— Добавить равный объем полной среды. Рекомендуется использовать среду Хэма F12 с 30% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота (Ham, 1965). Среда должна быть предварительно инкубирована с 5% CO_2, чтобы избежать нежелательного подщелачивания, а ее температура не должна превышать 30 °С во избежание прилипания клеток к стенкам сосуда (Ham, Puck, 1967).
— Разбавить суспензию так, чтобы в 5 мл содержалось 50—250 клеток и быстро внести суспензию в чашку Петри диаметром 5 или 6 см (см. ниже метод клонирования 1).
— Инкубировать в течение 8—15 дней при 37 °С в увлажняемом, продуваемом CO_2 термостате (разд. 6.9).

Если клетки быстро мигрируют, то может произойти смешивание колоний. Чтобы предотвратить это, следует использовать среду с 0,17 агара (разд. 8.1.4).

Для определения эффективности посева

— Фиксировать образующиеся клоны в 25%-ном формалине, окрасить по Гимза (приложение 2) и оценить эффективность посева.

Для клонирования

Метод 1

— Если предполагается выделение клонов, то культуральные сосуды должны содержать много небольших кусочков (0,05 см^2) покровных стекол, обеспечивающих прикрепление и размножение клеток. Используя стерильный пинцет, удалить кусочки стекол с индивидуальными клетками (при микроскопическом контроле) и перенести их в индивидуальные лунки пластинок для культивирования тканей (разд. 3.2.1).
— Добавить по 0,3 мл полной среды в каждую лунку и продолжать инкубацию до тех пор, пока клон не покроет поверхность лунки. Клонированные клетки после этого можно снять трипсинизацией (разд. 5.2) и перенести в подходящие культуральные сосуды.

Метод 2

— Клоны можно выделять из чашек диаметром 5 см с помощью цилиндров для клонирования из нержавеющей стали (около 6 мм диаметром и 12 мм высотой (Dow Corning Co.; приложение 3). Эти цилиндры и силиконовая смазка должны быть стерилизованы автоклавированием.
— Пометить положение хорошо изолированных колоний на обратной стороне культуральной чашки с помощью карандаша по стеклу или фломастера.
— Удалить среду и ополоснуть клетки СБСР (приложение 1).
— Используя стерильный пинцет, окунуть один конец цилиндра для клонирования в силиконовую смазку и поместить его над колонией, которую собираетесь выделять.
— С помощью шприца и иглы 20-го калибра добавить каплю 0,05%-ного трипсина в СБСР в цилиндр и после ослабления адгезии клеток отсосать их в шприц и перенести в чистую чашку Петри.

Метод 3

— Для клонирования разбавленную клеточную суспензию можно высевать на специальные чашки Петри, ростовая поверхность которых представляет собой мембранный фильтр (Pet-

riperm; приложение 3). Эти мембранные фильтры обеспечивают свободную диффузию газов и при этом могут быть легко разрезаны на кусочки. Поэтому из них легко вырезать кусочки, содержащие отдельные колонии, которые затем можно перенести в лунки в пластинке для культивирования тканей (ср. с использованием кусочков покровных стекол).

8.1.2. Капиллярный метод

Капиллярный метод, детально описанный в соответствующей монографии (Sanford, 1973), оказывается более трудоемким. Вместо выращивания клеток в микросреде капиллярных трубок Мак-Ферсон (Macpherson, 1973) рекомендует переносить их в микрокапле среды в лунку многолуночной полистиреновой пластинки, такой, например, как 96-луночный поднос фирмы Linbro Chem. Co. Inc. или Titertek Inc. (приложение 3).

Клетки вначале переводят в суспензию путем очень мягкой трипсинизации (см. выше), и затем индивидуальные клетки отсасывают микропипетками, изготовленными из стерильных стеклянных трубок из мягкого стекла, заткнутых с обеих сторон пробками. Вытягивание микропипеток из трубок проводится в две стадии. На первой стадии из трубки вытягивают две пастеровские пипетки с внешним диаметром кончика около 1 мм. На второй стадии узкую часть пипетки размягчают в верхней части пламени бунзеновской горелки и затем немедленно вытягивают, уменьшив диаметр кончика пипетки до 0,1 мм и менее.

Одиночные клетки следует перенести в лунки многолуночного подноса, после чего следует с помощью микроскопа удостовериться в том, что каждая лунка содержит только одну клетку. В каждую лунку добавляют затем по 0,1 мл среды и поднос инкубируют в увлажненном, продуваемом CO_2 термостате в течение 7—10 дней до получения больших колоний. Затем колонии переносят в чашки Петри диаметром 5 см или в маленькие флаконы.

Согласно другому методу (Copper, 1973), суспензию клеток разводят до концентрации 10 клеток в 1 мл. Важно, чтобы при этом клетки не агрегировали, т. е. должна быть истинная суспензия изолированных клеток. Аликвоты суспензии в 0,1 мл разносят по лункам пластинки для микротитрования и сразу после этого с помощью инвертированного микроскопа выявляют лунки, содержащие только одну клетку.

8.1.3. Клонирование под агаром

При определенных условиях клетки могут образовывать колонии, будучи не прикрепленными к стеклянному или пластиковому субстрату, а суспендированными в полужидком агаре. Вы-

явлены факторы, облегчающие рост клеток в полужидком агаре (Macpherson, 1973b). К числу этих факторов относятся трансформация клеток онкогенными вирусами, заражение микоплазмой, повышение концентрации сыворотки и добавление фидерных клеток или ДЭАЭ-декстрана для нейтрализации присутствующих в агаре кислотных групп.

— 1,25%-ный раствор бакто-агара (Difco) приготовить на горячей дистиллированной воде и стерилизовать автоклавированием. Агар осадить охлаждением и перед использованием нагреть в кипящей водяной бане и охладить до 44 °С.
— Добавить 20 мл сыворотки теленка или эмбриона крупного рогатого скота и 20 мл триптозо-фосфатного бульона (приложение 1) к 80 мл среды с удвоенной концентрацией питательных веществ (например, к среде МСИ Глазго; приложение 1) и прогреть смесь до 44 °С.
— Смешать приготовленную среду с расплавленным агаром до концентрации последнего 0,5% и осторожно перемешать.
— Перенести пипеткой 7 мл полученной среды с 0,5% агара в чашку Петри диаметром 5 см и выдерживать при комнатной температуре. Использовать в течение 1 ч.
— Смешать 1 объем клеточной суспензии с двумя объемами среды с 0,5% агара при 44 °С и добавить 1,5 мл полученной суспензии поверх слоя среды с агаром, упомянутой в предыдущем пункте. В полученных образцах обнаруживается до 10^3 колоний на чашку.
— Инкубировать в увлажняемом термостате с продувкой CO_2 в течение 7—10 дней; в течение этого времени образуются колонии клеток диаметром 0,1—0,2 мм.
— Колонии удалить из агара в пробирки, содержащие 1 мл среды, используя пипетки с тонко оттянутым кончиком.
— Диспергировать колонию клеток пипетированием.
— Перенести клетки в чашки Петри диаметром 5 см, добавить 5 мл не содержащей агара среды и инкубировать в увлажненном термостате при продувке CO_2.

8.1.4. Клонирование на фидерном слое

Полные монослои, содержащие $2 \cdot 10^6$ клеток на чашку, диаметром 90 мм подвергали воздействию γ-излучений в кобальтовой пушке дозой 4000—6000 рад. Облучение должно длиться менее 1 мин. Для этой цели пригодны различные линии клеток, например HeLa, 3T3 или BHK21/C13 (Puck et al., 1956). Эти клетки могут быть использованы либо непосредственно, либо в более мелких сосудах, куда они переносятся после трипсинизации. Клетки остаются живыми вплоть до четырех недель, но теряют способность к делению.

Другой способ получения слоя фидерных клеток — это инкубировать монослой клеток с митомицином С (10^{-6} М), что приводит к образованию поперечных сшивок в клеточной ДНК (Iyer, Szybalski, 1964). Монослой затем трижды промывают СБСР для удаления митомицина С, после чего его можно использовать либо непосредственно, либо после пересева клеток в культуральные сосуды меньшего размера. Для клонирования используются чашки Петри диаметром 6 см, содержащие $\sim 2 \cdot 10^5$ клеток, убитых либо γ-облучением, либо обработкой митомицином С. Эти клетки образуют слой фидерных клеток. Среду в чашках с фидерными клетками заменяют суспензией клеток, предназначенных для клонирования. На такие чашки можно высевать 10 клеток, но наилучшие результаты получаются при высеве 1000 клеток. Клонируемые клетки прикрепляются к субстрату в свободных участках между фидерными клетками и начинают размножаться, что приводит к образованию колоний, которые можно выделить с помощью цилиндров для клонирования (разд. 8.1.2).

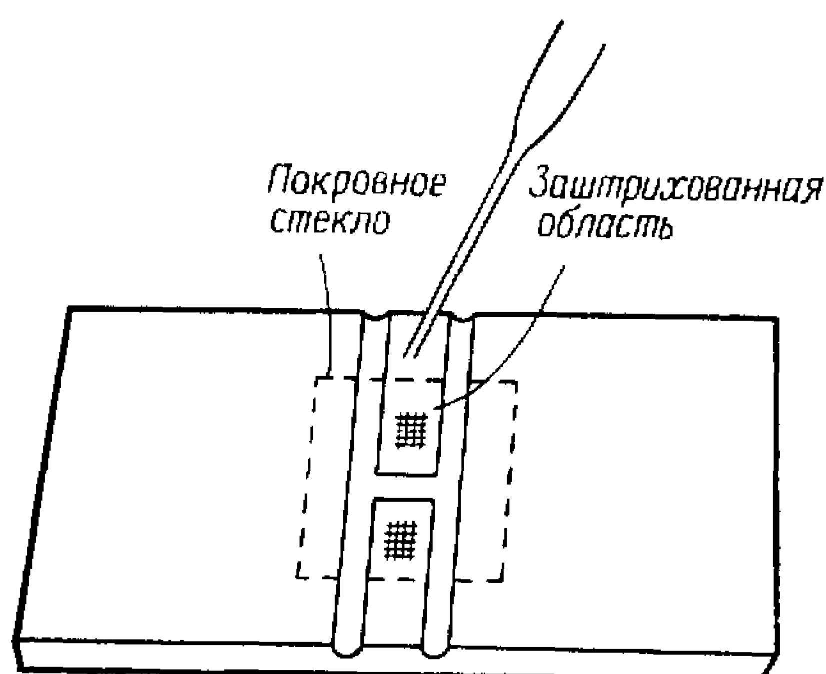
8.2. Методы счета клеток

Известны два метода оценки количества клеток в суспензии. С помощью гемоцитометра можно определить число клеток в заданном объеме путем прямого микроскопического наблюдения. При использовании электронного счетчика клеток, например счетчика Коултера, заданный объем клеточной суспензии протекает через специальную диафрагму, обеспечивающую электронную регистрацию клеток.

8.2.1. Гемоцитометр

Прецизионное шлифованное покровное стекло помещают на предметное стекло гемоцитометра (рис. 8.1) так, чтобы покрыть заштрихованные области, и слегка прижимают до появления колец Ньютона. Это приводит к образованию камеры с фиксированым объемом, поскольку края предметного стекла подняты над заштрихованной поверхностью ровно на 0,1 мм. Каждая заштрихованная область состоит из 9 больших квадратов размером 1×1, т. е. объем, ограниченный каждым большим квадратом, оказывается равным 1 мм · 1 мм · 0,1 мм = 0,1 мм^3. 4 квадрата в углах разделены на 16 меньших квадратов: центральный квадрат разделен на 25 меньших квадратов и остальные квадраты на 20 меньших квадратов, но для подсчета числа клеток это несущественно.

Каплю клеточной суспензии (содержащую 10^5—10^6 клеток в 1 мл) помещают на краю покровного стекла так, чтобы суспензия под действием капиллярных сил проникла в камеру



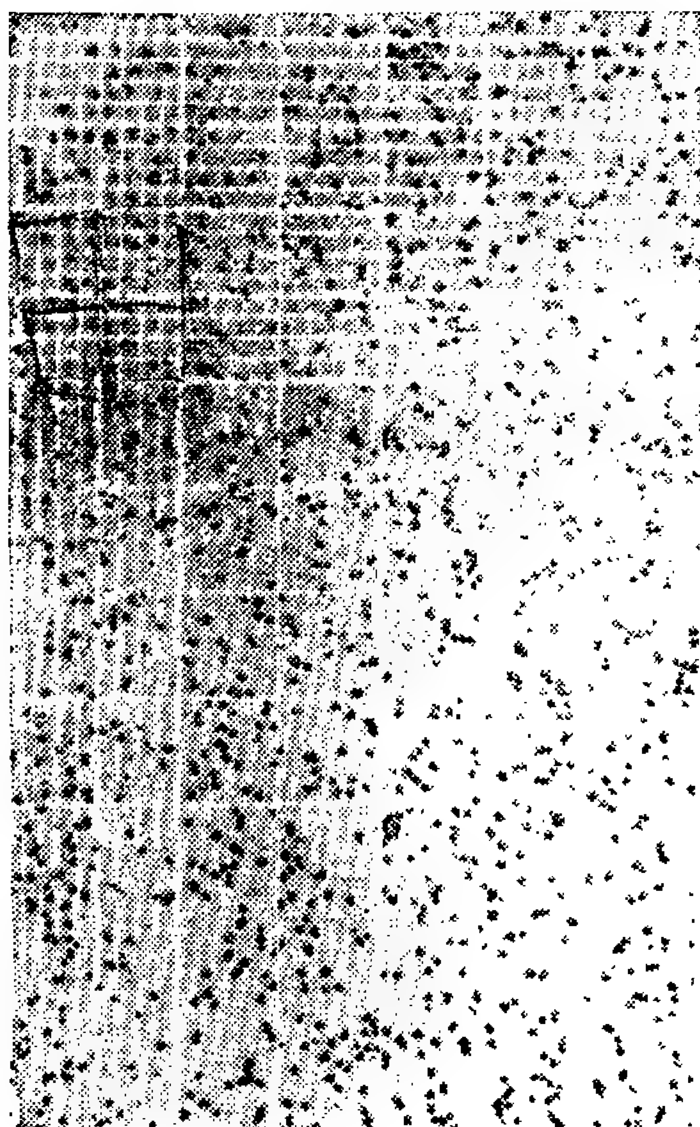


Рис. 8.1. Использование гемоцитометра. На диаграмме слева представлен модифицированный гемоцитометр Ньюбауэра, а справа микрофотография подготовленных для счета клеток ВНК21/С13.

(рис. 8.1). Не следует переполнять камеру. После заполнения камеру помещают под объектив микроскопа с малым увеличением.

Подсчитывают количество клеток в четырех больших квадратах в углах каждой из двух заштрихованных областей. Считают клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий. Поскольку объем большого квадрата составляет 0,1 $мм^3$, то умножив усредненное значение числа клеток в одном квадрате на 10^4, получают количество клеток в 1 мл суспензии.

8.2.2. *Электронный счетчик клеток*

Принцип этого метода заключается в следующем. Когда клетка проходит через диафрагму, электрический ток прерывается, что фиксируется как импульс, транслируемый на экран осциллоскопа и регистрируемый счетчиком (рис. 8.2). Величина наблюдаемого на осциллоскопе импульса пропорциональна объему клетки, а это позволяет усгановить электронные «ворота» для регистрации клеток определенного размера. Простейшие счетчики, например промышленная модель D счетчика Коултера, позво-

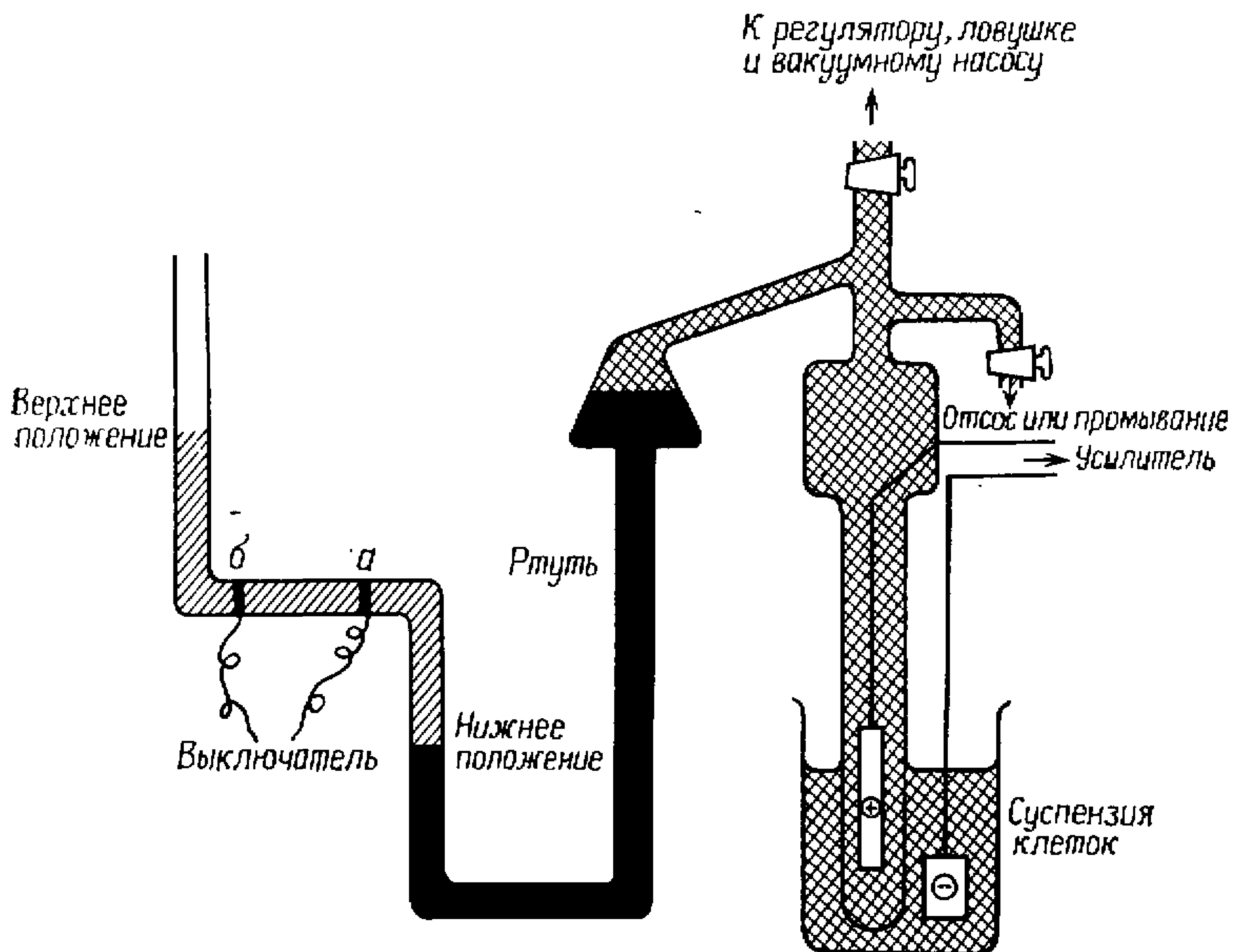


Рис. 8.2. Диаграмма электронного счетчика клеток. При открытом верхнем кране вакуумный насос устанавливает ртуть в манометре в положении, обозначенном черным цветом (нижнее положение). При закрытии крана ртуть возвращается к равновесному верхнему положению, что сопровождается прохождением суспензии клеток через небольшую диафрагму. Прохождение каждой клетки через диафрагму прерывает ток между электродами, что регистрируется счетчиком и наблюдается в виде импульса на экране осциллоскопа. Счет клеток производится только в период прохождения ртути между двумя контактами *а* и *б* (обычно 0,5 мл).

ляют устанавливать только нижние пороги ворот, что позволяет исключить из счета частицы пыли. Более сложные установки, например счетчик Коултера, модель ZB1, снабжены графопреобразователями, позволяющими автоматически определять число клеток в различных «воротах» и строить гистограммы, отражающие зависимость между числом клеток и их объемом (рис. 8.3).

Диафрагма, через которую проходят клетки, может быть различного размера, но для животных клеток используется рубиновая диафрагма диаметром 100 мкм и длиной 75 мкм. Следовательно, эта диафрагма довольно хрупкая и дорогая.

Готовят солевой раствор для счета клеток (0,7% NaCl, 1,05% лимонной кислоты и 0,1% хлористой ртути) и к 24,5 мл этого раствора добавляют 0,5 мл суспензии клеток (примерно 10^6 клеток в 1 мл). 0,7 мл суспензии и 16,8 мл солевого раствора для счета можно смешать также в универсальном контейнере. Полученную суспензию следует тщательно перемешать и

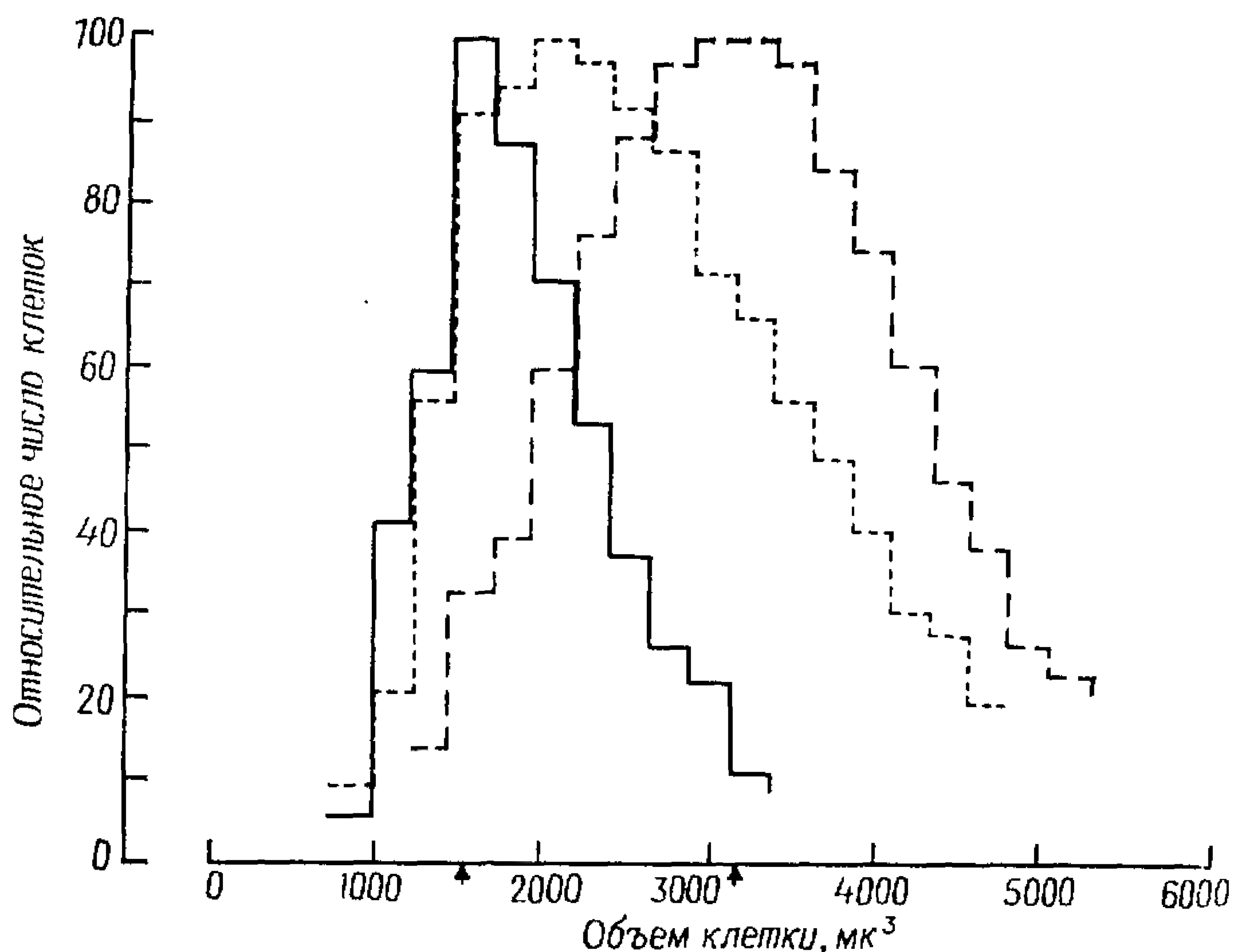


Рис. 8.3. Электронный графопреобразователь клеточного объема. Мышиные клетки L929 собирали на стационарной фазе роста культуры в момент времени 0 и высевали в среде, к которой через 8 ч добавляли тимидин (5 мМ). Через 24 ч тимидин удаляли из культуральной среды и через различное время клетки снимали со стекла трипсинизацией и измеряли их объем в счетчике Коултера модель В, снабженном графопреобразователем модели J. Непрерывная линия — 0 ч; прерывистая линия — 28 ч, пунктирная линия — 32 ч. Вместо этих моделей в настоящее время используется счетчик Коултера модель ZBI с канальным анализатором C1000. [Перепечатано из Adams, 1969b) с согласия издателей.]

установить на специальный столик счетчика, погрузив в нее трубку с диафрагмой и внешний электрод. После этого открывают верхний кран, соединяющий ртутный манометр с вакуумным насосом. В результате ртуть в манометре поднимается. Через несколько секунд верхний кран закрывается и ртуть в манометре возвращается в исходное положение. Это сопровождается просасыванием клеточной суспензии через диафрагму. В то же самое время ртуть включает электронный счетчик, проходя через первый контакт (*а* на рис. 8.2), и выключает счетчик, проходя через второй контакт (*б* на рис. 8.2). Объем ртути между контактами составляет 0,5 мл, и, следовательно, именно этот объем клеточной суспензии проходит через диафрагму в период включения счетчика.

Обычно просчитывается 0,5 мл суспензии, разведенной в 50 раз (т. е. 0,01 мл исходной суспензии), но эта величина может варьировать в зависимости от концентрации клеток в исходной суспензии.

8.2.3. Сравнение методов

Главным недостатком при использовании гемоцитометра является утомительность этого метода при большом количестве образцов. Кроме того, ошибка в определении количества клеток с помощью гемоцитометра достигает 10% (Sandford et al., 1951). Одним из источников этой ошибки могут быть неточности при разведении клеток, так что эту операцию следует проводить с большой тщательностью. К преимуществам метода относятся довольно низкая стоимость гемоцитометра (счетные камеры Ньюбауэра изготавливаются фирмой Gelman Hawksley) и возможность работать с очень небольшим количеством клеток. Гемоцитометр позволяет определить количество клеток в маленькой чашке после их трипсинизации в 1 мл среды.

Прямое наблюдение клеток при использовании гемоцитометра позволяет оценивать качество клеточной суспензии, т. е. выявлять наличие клеточных комков и разрушенных клеток. При разведении клеточной суспензии растворами витальных красителей, например трипанового синего до конечной концентрации 0,2 г/л в ФСБ-А (приложение 1), можно оценить количество жизнеспособных клеток путем подсчета неокрашенных клеток (*примечание*: трипановый синий токсичен и следует избегать его попадания на кожу).

Подсчет клеток в электронном счетчике оказывается более воспроизводимым. Поскольку просчитываются многие тысячи клеток, то ошибка, обусловленная непредставительностью выборки, очень мала, и легко достигается довольно высокая точность в определении концентрации клеток (с ошибкой определения $<5\%$). Главным источником ошибок в этом методе является исходный отбор клеточной суспензии, который следует проводить с большой тщательностью. С помощью электронного счетчика можно определять количество клеток и в маленьких чашках, но в этих случаях для подсчета должна быть использована почти вся клеточная суспензия. Если две или более клеток проходят через диафрагму одновременно, то они будут зарегистрированы как одна клетка: следовательно, при концентрации клеток выше 10^4 в расчете на 0,5 мл должна вводиться соответствующая поправка. При этой концентрации клеток ошибка, обусловленная совпадением прохождения, составляет 3%, но при концентрации клеток 10^5 на 0,5 мл эта ошибка возрастает до 22%. Большое преимущество метода — это возможность визуального наблюдения на экране осциллоскопа распределения клеток суспензии по размерам. С одной стороны, это позволяет оценить содержание в суспензии комков клеток, а с другой распределение анализируемых клеток по клеточному циклу (гл. 10).

Кроме того, использование «ворот» или «окон» в счетчике Коултера, модель ZB1, обеспечивает точное определение размеров клеток. Для этого установку следует прокалибровать с помощью пыльцевых зерен, размер которых известен. Так, средний объем пыльцевых зерен амброзии высокой достигает 3800 мкм³. При сопряжении счетчика с канальным анализатором автоматически регистрируется гистограмма распределения клеток по размерам (рис. 8.3). С другой стороны, используя приставку MCV/HCT, можно получить цифровую распечатку среднего размера клеток. Счетчик Коултера, модель D, стоит 1475 фунтов, а модель ZB1 — 3200 фунтов. Стоимость канального анализатора Коултера С-1000 с рекордером XY составляет 48 880 фунтов (цены на 1979 г).

8.3. *Хранение клеток*

Длительное хранение клеток при низкой температуре получило в наше время широкое распространение. В большинстве методов используется защитное действие глицерина на клетки в процессе замораживания.

При замораживании (особенно при быстром замораживании) происходят осмотические изменения, повреждающие липопротеиды и вызывающие появление разрывов в клеточных мембранах. Вещества, защищающие клетки, предотвращают эту избыточную концентрацию электролитов. Защитные вещества должны быть нетоксичны для клеток, иметь малую молекулярную массу и хорошую растворимость и легко проникать через мембрану живых клеток (Lovelock, Bishop, 1959). Глицерин остается наиболее предпочтительным защитным агентом, но некоторые клетки, например эритроциты крупного рогатого скота, плохо проницаемы для глицерина. Вместо глицерина обычно используется диметилсульфоксид.

Как правило, для наилучшего выживания клеток используются медленное замораживание и быстрое оттаивание клеток. Замораживание не должно быть слишком медленным, что облегчает рост кристаллов льда. При очень быстром замораживании не обеспечивается выход воды из клеток. Компромиссная скорость замораживания 1 °С/мин достигается следующим путем. Клетки в коробке из пористого полистерола (толщина стенок около 1,5 см) помещают на 2 ч в охлаждающую среду с температурой —70 °С, а затем переносят в жидкий азот. При температуре жидкого азота (—196 °С) клетки можно хранить в течение ряда лет без существенной потери жизнеспособности. Некоторые линии клеток, например клетки ВНКС13, могут храниться в течение многих месяцев при —70 °С, что очень удобно для постоянного использования клеток в лаборатории.

8.3.1. *Процедура замораживания*

— Выращивать клетки в бутылях Ру в течение 2—3 дней до достижения полного монослоя. Целесообразно сменять среду в культуре за 24 ч до сбора клеток.

— Собрать клетки из каждой бутыли Ру в отдельные универсальные контейнеры. Определить количество клеток. Каждую суспензию проверить на бактериальное заражение и оставить 10^6 клеток для анализа на содержание PPLO (гл. 9).

— Центрифугировать при 250 g в течение 5 мин для осаждения клеток. Тем временем приготовить среду для хранения следующего состава:

МСИ	65 мл
Сыворотка теленка	25 мл
Глицерин	10 мл

— Глицерин должен быть стерилизован автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин.

— Ресуспендировать клетки в среде для хранения до концентрации $5\cdot10^6$—$6\cdot10^6$ клеток в 1 мл. Вместо осаждения клеток центрифугированием суспензия может быть смешана с содержащей глицерин средой до конечной концентрации глицерина 10%.

— С помощью пастеровской пипетки перенести примерно 1,5 мл суспензии в стерильные легко запаиваемые стеклянные ампулы (2 мл) с синей точкой или желтой полосой, или в стерильные пластиковые ампулы (рис. 8.4). Стеклянные ампулы изготавливаются фирмой Epsom Gloss Industries Ltd., а пластиковые — фирмами Nunc или Sterilin Ltd. (приложение 3).

— Тщательно закупорить ампулы (стеклянные ампулы запаиваются на бунзеновской горелке, а пластиковые ампулы закрываются завертывающейся крышкой).

— Проверить тщательность закупоривания ампул, поместив их в раствор метиленовой синьки в метилированном спирте. Краситель проникает в недостаточно закупоренную ампулу.

— Промыть ампулы в метилированном спирте, высушить и пометить.

— Упаковать в полистироловый ящик и поместить в сухой лед. Скорость замораживания должна быть низкой, примерно 1 °С/мин.

— Установить ампулы (рис. 8.4) в держатели и ОСТОРОЖНО погрузить в сосуд с жидким азотом. Подходящие сосуды и держатели изготавливаются фирмами Union Carbide или British Oxygen Co. (приложение 3).

— Отметить особенности клеточных линий, хранящихся в со-

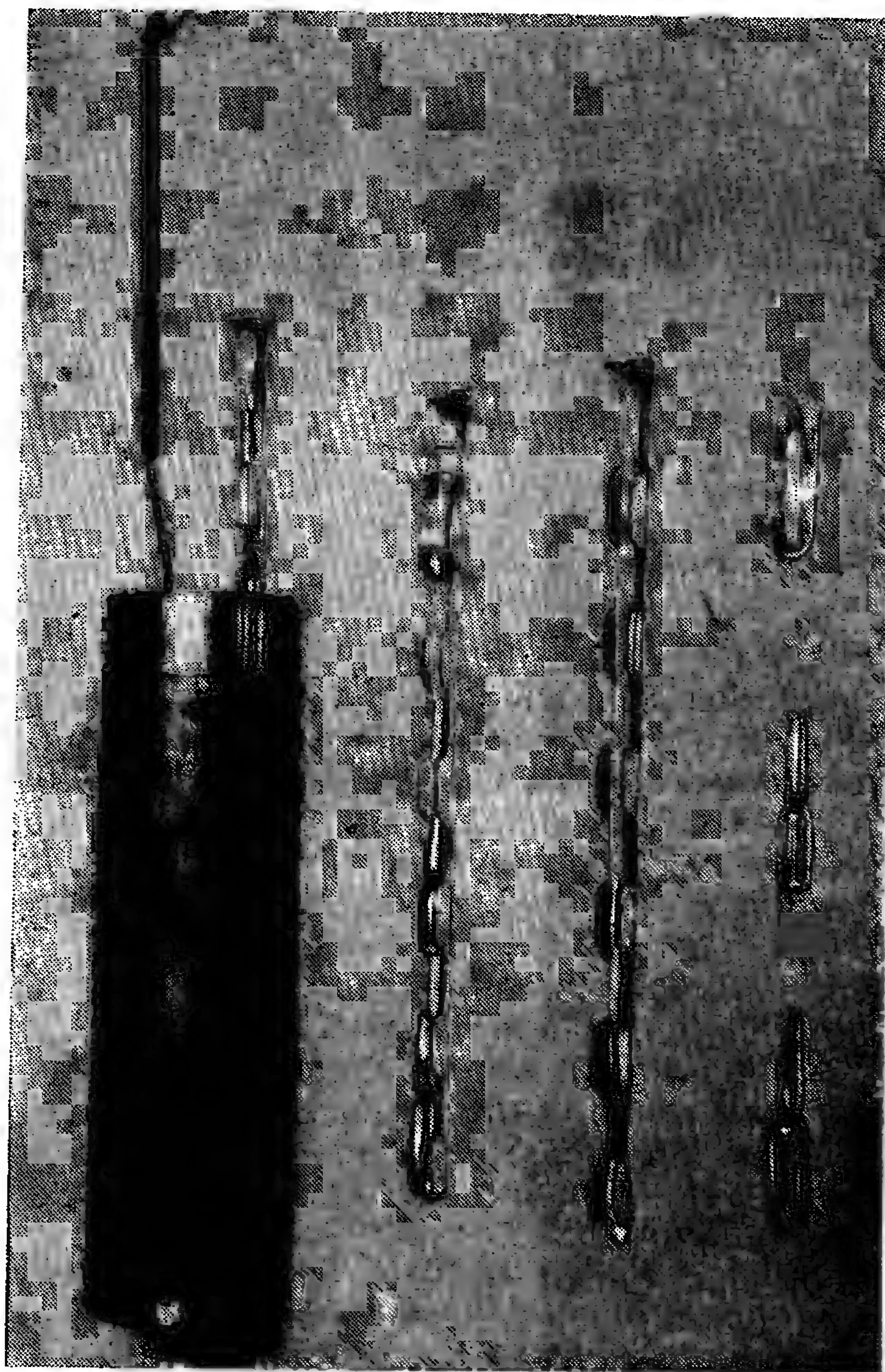


Рис. 8.4. Материалы, используемые для замораживания клеток. Справа (сверху вниз) — пластиковая ампула и стеклянные ампулы объемом 1 и 2 мл. После запаивания и охлаждения до —70 °С ампулы вставляются в держатели (в середине) и помещаются в контейнер (слева) для погружения в сосуд с жидким азотом.

суде с азотом, в соответствующем реестре. Вместо 10%-ного глицерина можно использовать 10%-ный диметилсульфоксид. В этом случае суспензия клеток вплоть до замораживания должна сохраняться во льду.

— При помещении материала в жидкий азот следует пользоваться перчатками, защитными очками или защитным щитком.

8.3.2. *Размораживание клеток после хранения в жидком азоте*

При удалении стеклянных ампул из жидкого азота следует соблюдать следующие предосторожности:

а) использовать плексигласовый защитный щиток,

б) надевать защитные перчатки,

в) после удаления из азота выдерживать держатель в течение 20—30 с перед извлечением ампулы. Если ампулы имеют тенденцию взрываться, то это происходит вскоре после удаления из азота.

— Подготовить плоский медицинский флакон объемом 100 мл с 10 мл ростовой среды. Насытить газовой смесью и прогреть при 37 °C.

— Соблюдая вышеупомянутые предосторожности, удалить ампулу из держателя.

— *Как можно быстрее* разморозить ампулу в водяной бане при 37 °C, слегка помешивая.

— Погрузить ампулу в 70%-ный спирт для внешней стерилизации. Сделать надрез на шейке ампулы и сломать шейку, придерживая края стерильными салфетками. Отвинтить крышку пластиковой ампулы.

— Перенести содержимое ампулы в прогретую среду в плоском медицинском флаконе. Инкубировать при 37 °C.

— После 24 ч инкубации слить среду и проверить ее на бактериальное заражение. Добавить 10 мл свежей прогретой ростовой среды.

— Инкубировать при 37 °C до достижения клетками полного монослоя.

8.3.3. *Организация стоков замороженных клеток*

При длительном культивировании клеточных линий и штаммов велика вероятность изменения свойств клеток. В культуре могут возникать мутанты, вытесняющие в ходе роста культуры исходные клетки. Экспериментатор должен быть уверен, что используемые в эксперименте клетки не изменяются с течением лет. Для этого их следует не пересевать слишком часто, а брать клетки из замороженного стока по крайней мере каждые 2 месяца. При получении линии или штамма клеток, которые предполагается использовать в качестве экспериментального материала в течение нескольких месяцев, прежде всего следует вырастить клетки в нескольких флаконах Ру для заморозки. Затем каждые 2 месяца следует размораживать новую порцию клеток и устанавливать свежую культуру. Пока замороженные клетки имеются в достаточном количестве, старые культуры надо выбрасывать. Прежде чем сток замороженных клеток исчерпает-

ся, следует приготовить новую партию клеток для заморозки. При пассировании всегда следует учитывать число пассажей, не забывая, что длительно пассируемые клетки могут стать неидентичными первоначальным.

В тех случаях, когда возникает необходимость в нескольких держателях с замороженными ампулами для каждого штамма клеток, может возникнуть необходимость в специальном помещении для хранения клеток в жидком азоте. Несмотря на это, рекомендуется всегда использовать замораживание клеток, поскольку в случае бактериального или другого загрязнения пассируемых клеток эта процедура всегда обеспечит исследователя клетками-дублерами.

8.4. Кариотипирование

Хромосомный набор клеток или клеточных гибридов служит важным критерием для прослеживания природы культивируемых клеток. С помощью этого критерия можно обнаружить взаимное загрязнение различных линий клеток или обнаружить хромосомную локализацию того или иного генетического маркера. При росте in vitro клетки часто изменяют свой хромосомный набор, и большинство клеточных линий утрачивают характерный диплоидный набор хромосом. Клетки становятся анеуплоидными и характеризуются широким диапазоном числа хромосом в расчете на клетку (разд. 2.1).

В метафазных клетках легко выявить общую массу хромосом, но трудно различить индивидуальные хромосомы. Для анализа присутствующих в клетках хромосом (кариотипирования) необходимо дать клеткам набухнуть в гипотоническом буфере так, чтобы при последующем высушивании на предметном стекле хромосомы оказались бы распластанными на обширном участке. Необходимо не допускать разрыва клеток в гипотоническом буфере, поскольку в этом случае будет невозможно определить принадлежность индивидуальных хромосом к той или иной клетке.

Поскольку даже в экспоненциально растущей культуре лишь небольшая часть клеток находится в митозе, то возникает необходимость увеличить их число, добавляя в культуру колцемид, блокирующий клетки в митозе (разд. 10.2). Действуя на веретено, такая обработка облегчает также разделение индивидуальных хромосом.

8.4.1. Приготовление хромосом для анализа

Метод (Hsu, 1973), который здесь описан, предназначен для распластывания хромосом одной клетки без перемешивания с хромосомами соседних клеток. (Другой метод включает в себя

обработку клеточного монослоя гипотоническим раствором перед фиксацией.)

а. Обработать экспоненциально растущие клетки колцемидом (0,06 мкг/мл) в течение 2 ч.

б. Трипсинизировать монослой и быстро осадить клетки.

в. Суспендировать клетки в 5 мл гипотонической среды (одна часть ростовой среды и две части воды) и оставить на 10 мин.

в′. Можно также ресуспендировать клетки в полной ростовой среде (для прекращения действия трипсина), дважды промыть СБСР, суспендировать клетки в небольшом объеме (0,5 мл) СБСР Хэнкса и добавить 2 мл воды. Для Q-сегментации рекомендуется 75 мМ KCl (см. ниже). Выдержать клетки в гипотонической среде в течение 8—10 мин.

г. Осадить клетки и добавить 4 объема фиксирующего раствора (3 части метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты), не нарушая целостность остатка.

д. После 10—20 (в зависимости от размера осадка) минут инкубации ресуспендировать клетки и осадить центрифугированием.

е. Ресуспендировать клетки в свежем фиксирующем растворе и центрифугировать.

ж. Повторить эту операцию дважды и ресуспендировать клетки в небольшом объеме фиксирующего раствора (1 мл или менее).

з. Погрузить вымытое предметное стекло в 40%-ный метанол и на влажную поверхность стекла добавить каплю клеточной суспензии, давая ей растечься по стеклу.

и. Высушить на воздухе и окрасить ацетоорсеином (2% орсеина в 45%-ной уксусной кислоте) в течение 3—4 мин, или по Гимза (приложение 2).

к. Промыть, высушить на воздухе и заключить под покровное стекло.

Более простой, хотя менее удовлетворительный по результатам метод заключается в выращивании клеток на покровном стекле и обработке их колцемидом, как указано выше. После этого покровное стекло с клетками инкубируют в течение 30 мин в теплом гипотоническом растворе (см. выше стадия «в′»), клетки фиксируют 10 мин и высушивают при комнатной температуре. После этого клетки окрашивают и покровное стекло монтируют на предметном клетками вниз.

8.4.2. Кариотипирование

Для получения кариотипа (хромосомный набор клетки) фотографируют серию метафазных пластинок, индивидуальные хромосомы вырезают и располагают в порядке убывания их размера (идиограмма на рис. 8.5). В большинстве случаев удается идентифицировать группы хромосом (например, у человека



Рис. 8.5. Хромосомы клеток BHK21/C13. Хромосомы вырезаны из фотографий метафазных пластинок клеток и расположены по группам в соответствии с их размером и отношением длин короткого и длинного плеча (Marshall, 1972). Выявляемые радиоавтографически зерна серебра свидетельствуют о гибридизации in situ с тритированной полиуридиловой кислотой (Steffensen, 1977). Для проведения гибридизации фиксированные клетки обрабатывали 0,2 н. HCl для удаления основных белков и рибонуклеазой (100 мкг/мл в СБСР двойной крепости), после чего ДНК денатурировали в 0,07 н. NaOH в течение 2 мин. Препараты промывали 3 раза 70%-ным этанолом и высушивали. К клеткам на покровных стеклах добавляли 10 мкл (140 нг) ^{3}H-полиуридиловой кислоты в СБСР тройной крепости и инкубировали в течение ночи при 20 °С. Клетки тщательно промывали в СБСР двойной крепости, повторно обрабатывали рибонуклеазой (20 мкг/мл при 20° в течение 30 мин), трижды промывали СБСР двойной крепости, затем 70- и 95%-ным этанолом и высушивали на воздухе. Для получения радиоавтографов клетки покрывали эмульсией Kodak AR10 [Перепечатано с любезного разрешения автора (Shenkin, 1974)].

хромосомы образуют 7 групп), но изредка удается идентифицировать индивидуальные хромосомы исключительно по их размеру и положению центромеры.

Кариотипирование резко облегчилось после того, как была обнаружена способность некоторых красителей вызывать характерную окраску индивидуальных хромосом. Было показано (Caspersson et al., 1970a, b; 1971), что акрихин-иприт и акрихиндигидрохлорид (рис. 8.6) вызывают характерную исчерчен-

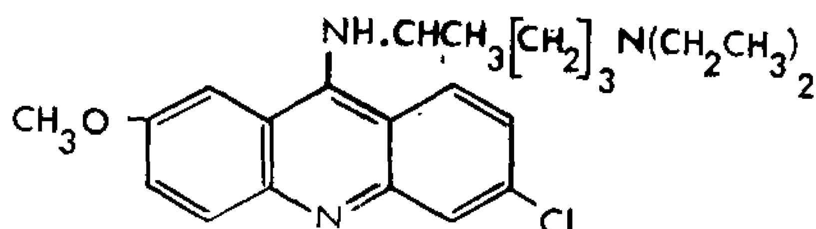


Рис. 8.6. Акрихин, или атебрин.

ность хромосом (Q-сегментация), а позднее было обнаружено, что комплементарные полосы образуются при окраске по Гимза (G-сегментация), если хромосомы предварительно обработать трипсином или слабым раствором щелочи (Patil et al., 1971; Seabright, 1971; Wang, Federoff, 1972).

8.4.3. Q-сегментация (Caspersson et al., 1970a; Lin et al., 1971)

— Приготовить предметные стекла, на которых клетки (набухшие в 75 мМ KCl) фиксированы, как указано выше (разд. 8.4.1, пункты «а» — «з»).
— Погрузить стекло с клетками в дистиллированную воду на несколько секунд. Перенести в окрашивающий раствор [0,5%-ный раствор акрихин-дигидрохлорида (вес на объем) в 0,1 М фосфатном буфере pH 4,5]. Краситель производится фирмой G. T. Gurr Ltd. под названием «атебрин» (приложение 3).
— После 15 мин окрашивания промыть препараты тремя сменами дистиллированной воды. Продолжительность промывки 10 мин.
— Высушить на воздухе и заключить под покровное стекло в капле дистиллированной воды. Края покровного стекла заклеить парафином.
— *Как можно скорее* исследовать препарат в флуоресцентном микроскопе.
— Использовать для возбуждающего света фильтр № 1 (BG12) и запирающий фильтр № 47.

В первоначальном методе Касперсона для окраски использовался раствор акрихин-иприта (5 мг% в 0,09 М Na_2HPO_4 и 8,7 мМ лимонной кислоты, pH 7,0). После 20 мин окрашивания клетки трижды промывали в том же буфере или дистиллированной воде, pH 7,0, и заключали под покровное стекло для исследования в флуоресцентном микроскопе.

8.4.4. G-сегментация (Wang, Federoff, 1973; Moorhead et al., 1960)

Обработка метафазных хромосом разведенным раствором трипсина приводит к удалению или перераспределению негистоновых белков в хромосомах, что вызывает появление у хромосом поперечной исчерченности, наблюдаемой в фазово-контрастном микроскопе[1]. Эти полосы можно контрастировать с помощью окраски по Гимза, причем окрашенные полосы оказываются соответствующими ярко флуоресцирующим Q-сегментам.

---

[1] Точный механизм образования G-полос до сих пор не выяснен. — *Прим. ред.*

Растущие клетки обрабатываются колцемидом (0,4 мкг/мл в течение 3 ч при 37 °С), и если клетки росли в монослое, то их следует снять с подложки с помощью трипсина.

— Осадить клетки 5 мин при 200 g и суспендировать в гипотоническом растворе KCl (0,075 *M*, 5 мл).
— Выдержать клеточную суспензию в течение 8 мин и добавить каплю холодного фиксирующего раствора (метанол: ледяная уксусная кислота, 3 : 1).
— Осторожно перемешать и осадить клетки при 4 °С.
— Слить надосадочную фракцию и осторожно добавить свежий фиксирующий раствор, не суспендируя клетки.
— После 30 мин фиксации суспендировать клетки, осадить центрифугированием, снова суспендировать в фиксирующем растворе и осадить центрифугированием.
— Окончательно ресуспендировать клетки в 0,25 мл фиксирующего раствора, перенести каплю суспензии на вымытое обезжиренное стекло и быстро высушить на воздухе.
— Обработать фиксированный препарат трипсином (0,025%-ный версен, pH 7,0) в течение 10—15 мин при 30 °С. Это приводит к заметному набуханию хромосом. Продолжительность обработки можно контролировать с помощью фазово-контрастной микроскопии. Обработку можно заканчивать, когда сестринские хроматиды сливаются, образуя единую структуру.
— Промыть в 70—80%-ном абсолютном этаноле и высушить на воздухе.
— Окрашивать 12 мин по Гимза (pH 7,0, приложение 2).
— Промыть в дистиллированной воде и высушить на воздухе.

Высушенные препараты клеток могут быть также окрашены дигидрохлоридом акрихин-иприта (50 мкг/мл в буфере Макилвайна — 6,5 мл 0,2 *M* Na_2HPO_4, 43,6 мл 0,1 *M* лимонной кислоты и H_2O до конечного объема 100 мл, pH 7,0). После 20 мин окрашивания стекла с клетками промыть трижды буфером Макилвайна и заключить в капле буфера под покровное стекло для наблюдения в флуоресцентном микроскопе.

8.5. *Визуализация клеток*

Главным преимуществом использования клеточных культур является возможность непрерывного наблюдения за клетками в ходе всего эксперимента. Поскольку живые клетки почти прозрачны, такое наблюдение осуществляется, как правило, с помощью фазово-контрастного микроскопа. Клетки растут на дне флакона или на боковой стороне бутыли, и толщина сосуда оказывается слишком велика, чтобы через нее можно было бы сфокусировать объектив микроскопа на клетки. В связи с этим были сконструированы микроскопы, у которых объективы рас-

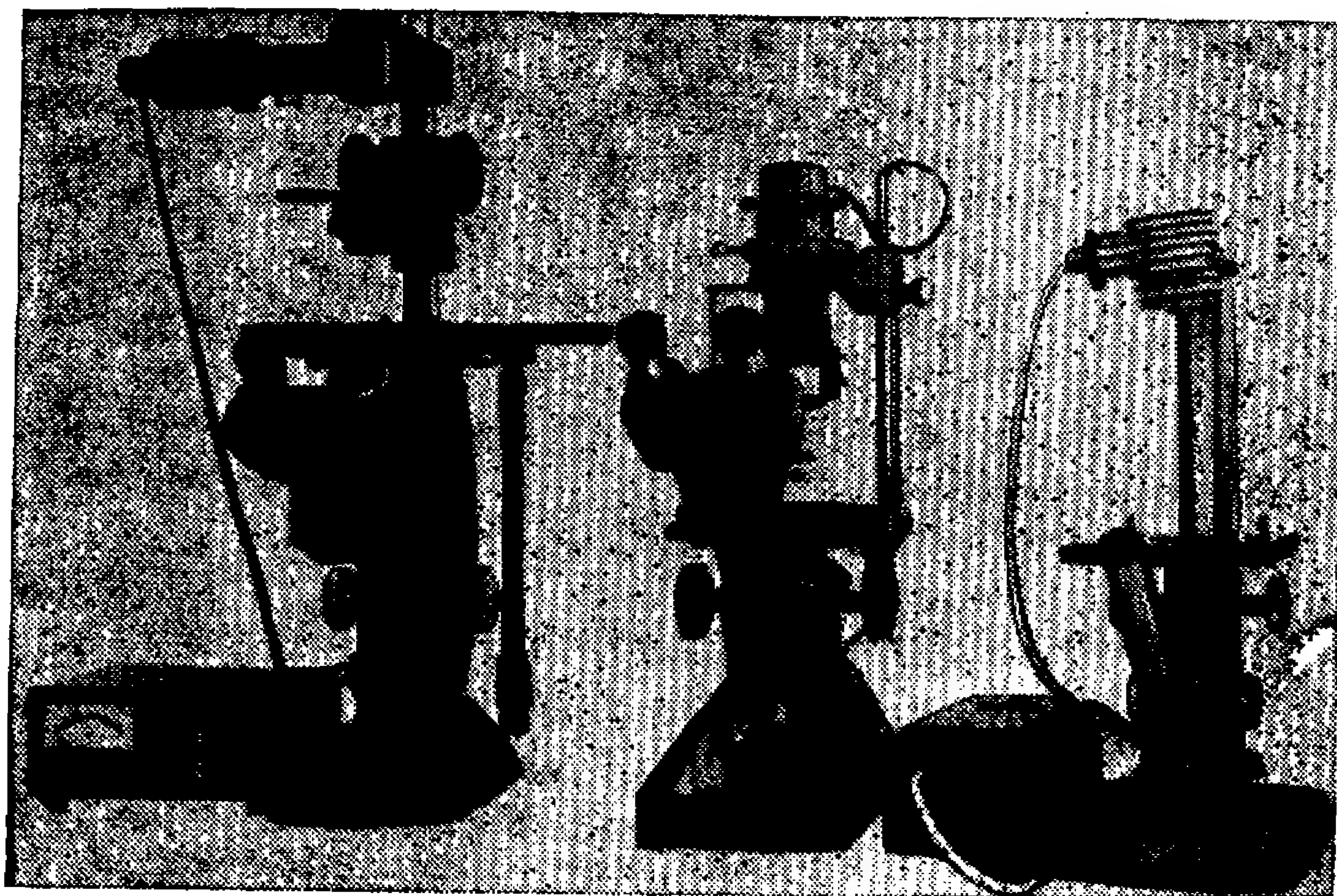


Рис. 8.7. Инвертированные микроскопы. Слева направо Wild, Olympus и Prior.

положены под предметным столиком. Такие инвертированные микроскопы (рис. 8.7) изготавливаются большинством фирм, выпускающих микроскопы. При работе с инвертированным микроскопом следует учитывать два важных фактора: а) блок осветителя должен адекватно вентилироваться при продолжительном использовании в теплой комнате (37 °С) и б) расстояние между предметным столиком и конденсатором должно быть достаточно велико, чтобы там можно было бы расположить наиболее крупные вращающиеся бутыли.

8.5.1. Фазово-контрастная микроскопия (Gray, 1972; Bradbury, 1976)

Этот метод чрезвычайно удобен для прижизненного наблюдения за клетками, которые почти прозрачны. Материал клетки изменяет волновые свойства проходящего светового луча, а это может быть обнаружено с помощью фазового микроскопа. Система основана на изменении фазы световых лучей, проходящих через оптическую систему микроскопа.

1. Приблизительно сфокусировав микроскоп на препарате, отрегулировать положение конденсатора таким образом, чтобы ирисовая диафрагма (частично закрытая) оказалась в центре поля зрения в фокусе объектива.
2. Сфокусировать микроскоп на препарат.
3. Заменить один из окуляров вспомогательным микроскопом и сфокусировать его на темное кольцо фазовой пластинки.

4. С помощью центрирующих рукояток совместить светлое кольцо с темным фазовым кольцом.
5. Установить вместо вспомогательного микроскопа окуляр.

Вместо фазово-контрастной микроскопии может быть использована дифференциальная интерференционная контрастирующая микроскопия по Номарскому, которая позволяет получить изображение, приближающееся к трехмерному. Для этого метода необходимо использовать планахроматные объективы и интерференционный конденсор Номарского, которые не входят в комплектацию инвертированных микроскопов.

8.5.2. Флуоресцентная микроскопия (Narin, 1969)

Этот метод используется обычно при наблюдении клеток, обработанных флуоресцирующими антителами (разд. 14.3.2), или при изучении окрашенных акрихином хромосом (разд. 8.4.3). С помощью флуоресцентной микроскопии можно наблюдать нуклеиновые кислоты и другие клеточные компоненты при возбуждении их флуоресценции светом с длиной волны около 260 нм. Важно использовать достаточно мощный источник света с достаточно короткой длиной волны. Обычно для этой цели применяется ртутная лампа, но некоторые работы могут проводиться с более дешевой кварцевой иодидной лампой.

Вначале свет от лампы проходит через первичный фильтр, пропускающий лучи только той длины, которая необходима для возбуждения флуоресценции. При прохождении этого света через препарат в флуорофорах возбуждается более длинноволновое излучение. Второй, запирающий, фильтр отсекает возбуждающий свет и обеспечивает прохождение в окуляр только возбужденного длинноволнового света.

В наиболее современных флуоресцентных микроскопах первичный фильтр заменяется на систему зеркал, например иллюминатор Ploem в микроскопе Leitz, которые выполняют ту же функцию.

Глава 9

Загрязнения

9.1. *Бактериальные загрязнения*

Культуральная среда создает прекрасные условия для роста микробных загрязнений, а обычная методика работы с клетками, включающая в себя частые открывания культуральных сосудов, обеспечивает массу возможностей возникновения такого загрязнения. Организм человека обладает многими защитными механизмами против инфекции, а культивируемые клетки защищены только аккуратностью работы исследователя. В кратковременных культурах обычно используются антибиотики, но при длительном культивировании их применение нежелательно. Поэтому при работе с клетками следует принимать строгие меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения микроорганизмами, и проводить адекватные тесты для оценки эффективности этих мер предосторожности.

9.1.1. *Стеклянная и пластиковая посуда*

Методы подготовки стеклянной посуды описаны в гл. 3. Если стерилизация проведена в соответствии с указанными правилами, то стеклянная посуда не может быть источником бактериального загрязнения. Пластиковая посуда поставляется фирмами в стерильном виде. Как правило, стерилизация пластика достигается обработкой этиленоксидом или облучением, после чего посуда упаковывается в целлофан.

9.1.2. *Клетки*

Загрязняющие микроорганизмы могут присутствовать в клетках еще в момент их выделения. Процедуры получения первичных клеток должны обеспечивать удаление этих загрязнений. Все клетки, поступающие в лабораторию, должны быть тестированы на наличие загрязнений; лишь после этого их можно использовать для пересева, если в лабораторном помещении проводится пересев других клеток.

9.1.3. *Среда*

Некоторые компоненты, такие, как сбалансированные солевые растворы и версен, термостабильны, и обычно их стерилизуют автоклавированием. Большинство органических соединений, ис-

пользуемых при культивировании клеток, стерилизуются фильтрованием. Для материалов, стерилизуемых нагреванием, обычно применяется контроль с помощью индикатора стерилизации, включаемого в каждый стерилизуемый набор материалов. Обычно бывает достаточным вкладывать в каждый пакет автоклавную ленту, но при стерилизации растворов или больших емкостей, например пеналов для пипеток, рекомендуется использовать жидкий индикатор, вкладываемый в каждую бутыль или пенал.

9.2. *Проверка стерильности*

Проверка стерильности должна проводиться для всех партий среды и трипсина перед их использованием. Поскольку некоторые тесты длятся несколько недель, важно иметь в своем распоряжении адекватные стоки. Использование нетестированной среды — верный путь внести бактериальное загрязнение во все линии клеток, используемые в лаборатории. Культуры клеток также следует постоянно тестировать на загрязнение. Это тестирование включает в себя как анализ культуральной среды, в которой росли клетки, так и анализ самих клеток.

Ни один единичный тест сам по себе не обеспечивает выявления всех возможных микроорганизмов, в связи с чем следует проводить множественные тесты. Организмы, растущие в культуральной среде, легко выявляются, если загрязненная ими среда инкубируется в течение нескольких дней. Такое загрязнение не представляет серьезной проблемы, поскольку эксперимент можно быстро закончить и зараженные культуры выбросить. Основную опасность представляют медленно растущие загрязняющие микроорганизмы, которые не вызывают видимых изменений в среде и не обладают выраженным цитостатическим действием. Такие микроорганизмы могут остаться незамеченными и при этом они могут решительно повлиять на результаты биохимических экспериментов; так, появление полосы сателлитной ДНК при анализе в градиенте плотности CsCl или необычной формы фермента могут быть обусловлены присутствием загрязняющих микроорганизмов.

Для выявления медленно растущих загрязняющих микроорганизмов образцы (обычно 0,5—1 мл) культуральной среды, клеточной суспензии или трипсина вносят в серии питательных бульонов (20 мл) или на питательный агар. Величина инокулята выбирается произвольно, но при очень низком содержании бактериального загрязнения она может оказаться лимитирующим фактором.

Существует мнение, что все свежеприготовленные культуральные растворы следует проверять на возможные загрязнения перед добавлением антибиотика (Armstrong, 1973).

— Инкубировать образцы при 37 °С в течение недели.
— Аликвоты образцов (1 мл) внести в тиогликоллатный бульон и в жидкую среду Сабората (приложение 4).
— Одновременно нанести аликвоты образцов на две пластинки с кровяным агаром и две дезоксихолатные пластинки.
— Инкубировать, как указано в таблице.

	Температура		Аэробиоз	Анаэробиоз
	20 °С	37 °С		
Тиогликоллатный бульон	+	+	+	
Среда Сабората	+	+	+	
Пластинка с кровяным агаром		+	+	+
Дезоксихолатная пластинка		+	+	+

Существует множество других бульонов для выявления бактериальных и дрожжевых загрязнений. К ним относятся бульон с экстрактом мозга и сердца, триптозофосфатный бульон и триптиказный соевый бульон. Они готовятся по прописям производящих их фирм Oxoid Ltd. или Difco Labs. (см. приложение 3), но некоторые рекомендации даны в приложении 4.

Продолжительность инкубации в различных тестах составляет не менее 7 суток, хотя большинство загрязнений выявляется уже через 2 дня. Инкубацию следует проводить при двух температурах: при 37 °С и при 30 или 20 °С. Пластинки агара следует помещать в закрытые контейнеры или в увлажненный термостат, чтобы избежать их высыхания. Контейнеры имеются в открытой продаже. Они не только поддерживают необходимую влажность, но и обеспечивают инкубацию в анаэробных условиях после удаления следов кислорода. При образовании осадков в жидких бульонах необходимо провести микроскопический анализ осадков для определения их природы. Это следует проводить в конце рабочего дня после тщательного обеззараживания рабочего места и окружающего воздушного пространства.

9.3. Анализ бактериальных загрязнений

Асептически выделить образец «загрязненной» среды и центрифугировать при 20 000 g в течение 20 мин.

С помощью стерильной петли перенести осадок на пластинку с кровяным агаром (приложение 4) и инкубировать при 37 °С в течение 2—7 дней. Этого времени достаточно для выявления всех бактериальных загрязнений.

Приготовить мазки образцов на стеклянных предметных стеклах и высушить на воздухе перед окраской красителем Грама или метиленовым синим (приложение 2).

9.4. *Загрязнения из воздуха*

Несмотря на все вышесказанное, главной причиной загрязнения оказывается неадекватность асептических условий эксперимента, позволяющая микроорганизмам попадать в культуру от персонала. Такое загрязнение из воздуха происходит в периоды, когда культуральная посуда оказывается открытой.

При удалении из сосуда 10 мл клеточной суспензии в него входит 10 $см^3$ воздуха. В связи с этим необходимо до минимума снижать содержание в воздухе микроорганизмов. В невентилируемой комнате споры бактерий и грибов быстро оседают на пол и стулья, так что в таких случаях достаточно постоянного мытья пола и стульев антисептическими растворами. Пол в рабочей комнате должен быть без щелей, и его следует ежедневно мыть дезинфицирующими растворами. Рабочую поверхность стола следует до и после работы протирать 70%-ным спиртом. Помимо всего прочего, это приводит к ликвидации попавших на стол культивируемых клеток и исключает возможность их попадания в другие культуры (разд. 2.1).

Рекомендуется также, чтобы воздух, проникающий в комнату для пересева культур, проходил через высокоэффективные фильтры (HEPA), удаляющие из воздуха практически все частицы размером больше 0,3 мкм и стерилизующие таким образом попадающий в комнату воздух.

Пока комната не используется, воздух в ней может быть стерилизован ультрафиолетовыми гермицидными лампами. Лампы устанавливаются в таких положениях, чтобы освещалась вся комната; они должны быть достаточно мощными, чтобы излучение достигало углов комнаты.

Многие из этих превентивных мер заметно упрощаются, если вместо комнаты для пересева клеток использовать боксы (см. ниже).

Помимо всех этих мер предосторожностей, горлышки всех бутылей и концы пипеток следует «обжигать» в пламени горелки. Это делается не для стерилизации стекла, а для повышения его температуры выше окружающей, что приводит к увеличению тока воздуха у горла бутыли или конца пипетки. В результате предотвращается оседание загрязнений из воздуха в бутыли и на пипетки.

9.4.1. *Асептическая техника*

Все детали хорошей асептической техники нельзя описать в книге. Они могут быть освоены лишь при практической работе

под руководством опытного оператора. Требования, предъявляемые к асептической технике, основаны главным образом на здравом смысле. Ниже перечислено несколько рекомендуемых операций и предостережений.

— Всегда используйте пипетки с ватными пробками, причем рекомендуется использовать автоматические пипетки или пипетки с резиновыми трубками. Эти короткие резиновые трубки позволят вам работать с пипеткой, не нагибаясь над сосудом.

— Вынимая пипетки из пенала, не дотрагивайтесь до остальных пипеток. Это достигается встряхиванием пенала, пока несколько пипеток не высунутся из открытого конца. Если вы случайно дотронулись до другой пипетки, то ее следует немедленно удалить.

— Как можно скорее закрывайте крышки пенала с пипетками и бутылей.

— Выбрасывайте всю использованную стеклянную посуду, которая может служить источником загрязнения, в ванну с дезинфицирующим раствором (хлоросом).

— Не оставляйте вокруг капель среды, которые могут служить питательной средой для бактерий.

— Если вы уронили пробку от бутыли, используйте новую, стерильную.

— Все бутыли со средой, предварительно прогретые в водяной бане, следует тщательно протирать тканью (но не грязным полотенцем) перед внесением в культуральную комнату. В водяную баню следует добавлять бактериостатические агенты, например панацид (British Drug House Ltd.; приложение 3).

— В сомнительных случаях протирайте поверхность всех бутылей тканью, смоченной в 70%-ном спирте.

При соблюдении всех этих предосторожностей единственным остающимся источником загрязнения оказывается сам исследователь, работающий с клетками. Исследователь несет микроорганизмы на одежде и на теле, особенно на волосах. В связи с этим целесообразно использовать чистый лабораторный халат специально для работы в культуральной комнате и ни в коем случае не переходить из вивария в лабораторию, где ведется культивирование клеток, в одном и том же халате. Людям с длинными волосами следует их подкалывать и пользоваться чистыми лабораторными шапочками. Рекомендуется также использовать марлевые лицевые повязки, особенно когда здоровье исследователя вызывает сомнение.

9.4.2. Система с ламинарным током воздуха

Боксы с ламинарным током воздуха обеспечивают вхождение в бокс воздуха через фильтры НЕРА и прохождение тока воздуха над рабочей поверхностью перед выходом его из бокса позади исследователя. Ток воздуха является ламинарным и может быть вертикальным (от потолка к полу) или, что чаще, горизонтальным. Частицы вещества и аэрозоли, образующиеся в боксе, удаляются током воздуха в течение нескольких секунд.

Другой тип боксов с ламинарным током воздуха требуется при работе с клеточными культурами, зараженными болезнетворными вирусами. В этих случаях образующиеся в боксе аэрозоли могут обладать биологической опасностью, а выходящий из бокса воздух не должен попадать в атмосферу раньше, чем он будет стерилизован пропусканием через вироцидные фильтры.

Использование систем с ламинарным током воздуха делает невозможным перенос бактерий от исследователя в культуру, и в принципе такие системы с ламинарным током воздуха обеспечивают идеальную защиту как культур, так и самих исследователей. Однако уже сам факт, что в поток воздуха попадают руки, нарушает ламинарность и создает завихрения. По этой причине боксы с ламинарным током воздуха следует использовать как дополнение к стандартной асептической технике. Боксы с ламинарным током воздуха особенно рекомендуются тем исследователям, которые желают работать с клетками, но не имеют соответствующего помещения. Боксы могут быть использованы в общей лаборатории без риска загрязнения при условии соблюдения правил асептической техники. При использовании бокса исследователь избегает необходимости работать в маленькой комнате, в которой может быть слишком жарко и душно при отсутствии мощной вентиляционной системы, а кроме того, голова исследователя оказывается отделена от культур пластиковой крышкой бокса, что дополнительно снижает вероятность загрязнения.

9.5. Антибиотики

Использование антибиотиков в стоках культур крайне нежелательно. Невольное ослабление строгости требований асептической техники при использовании антибиотиков приводит к заметному загрязнению культур. Рост загрязняющих бактерий может тормозиться антибиотиками, но биохимические изменения могут все же иметь место. При селективных условиях происходит отбор резистентных к антибиотикам микроорганизмов, а затем эти микроорганизмы, как лесной пожар, могут распространиться по всем культурам лаборатории.

Использование антибиотиков должно быть ограничено кратковременными экспериментами. Эти эксперименты могут включать в себя наращивание большого количества клеток в течение недели или около того, и пересев такого большого количества клеток и последующие манипуляции трудно выполнить с соблюдением правил асептической техники. В конце эксперимента такие культуры нельзя возвращать в стоки. Их следует считать загрязненными.

9.6. Удаление загрязненного материала

Сосуды с явным бактериальным загрязнением не следует открывать, а следует немедленно подвергнуть автоклавированию. Если же желательно выявить природу загрязнения, то образец необходимо отобрать в асептических условиях, чтобы избежать распространения инфекции. Лучше всего сделать это в конце рабочего дня, после чего рабочее место нужно тщательно продезинфицировать и оставить на ночь под ультрафиолетовым облучением. Загрязненные бактериями чашки перед автоклавированием следует продезинфицировать в специальных мешках (Sterilin Ltd.) и термостат также продезинфицировать, протирая его тканью, смоченной дезинфицирующим раствором.

Радиоактивную загрязненную посуду также следует автоклавировать (чашки перед автоклавированием продезинфицировать) и затем обработать, как это рекомендуется для радиоактивной посуды.

9.7. Микоплазмы (Smith, 1971)

К микоплазме относят мелкие прокариотические клетки (0,3—0,5 мкм в диаметре), которые могут образовывать небольшие колонии, напоминающие колонии агента, вызывающего плевропневмонию крупного рогатого скота. Отсюда другое название клеток микоплазмы — плевропневмониеподобные организмы (PPLO — pleuropneumonia-like organisms). Эти агенты лишены клеточных стенок и, следовательно, могут расти только в определенных средах. При росте в агаре клетки PPLO образуют колонии, напоминающие вареные яйца с утолщенной центральной частью (рис. 9.1).

Известны несколько серологических групп микоплазм, относящихся к двум родам (*Micoplasma* и *Acholeplasma*). Одно время считалось, что эти клетки могут быть получены от L-форм бактерий. Однако было показано, что они неспособны ревертировать к бактериальным формам и, как теперь стало известно, не образуют стабильных видов.

Хотя культуры первичных клеток не загрязнены микоплазмой, но многие линии и штаммы клеток содержат такое за-

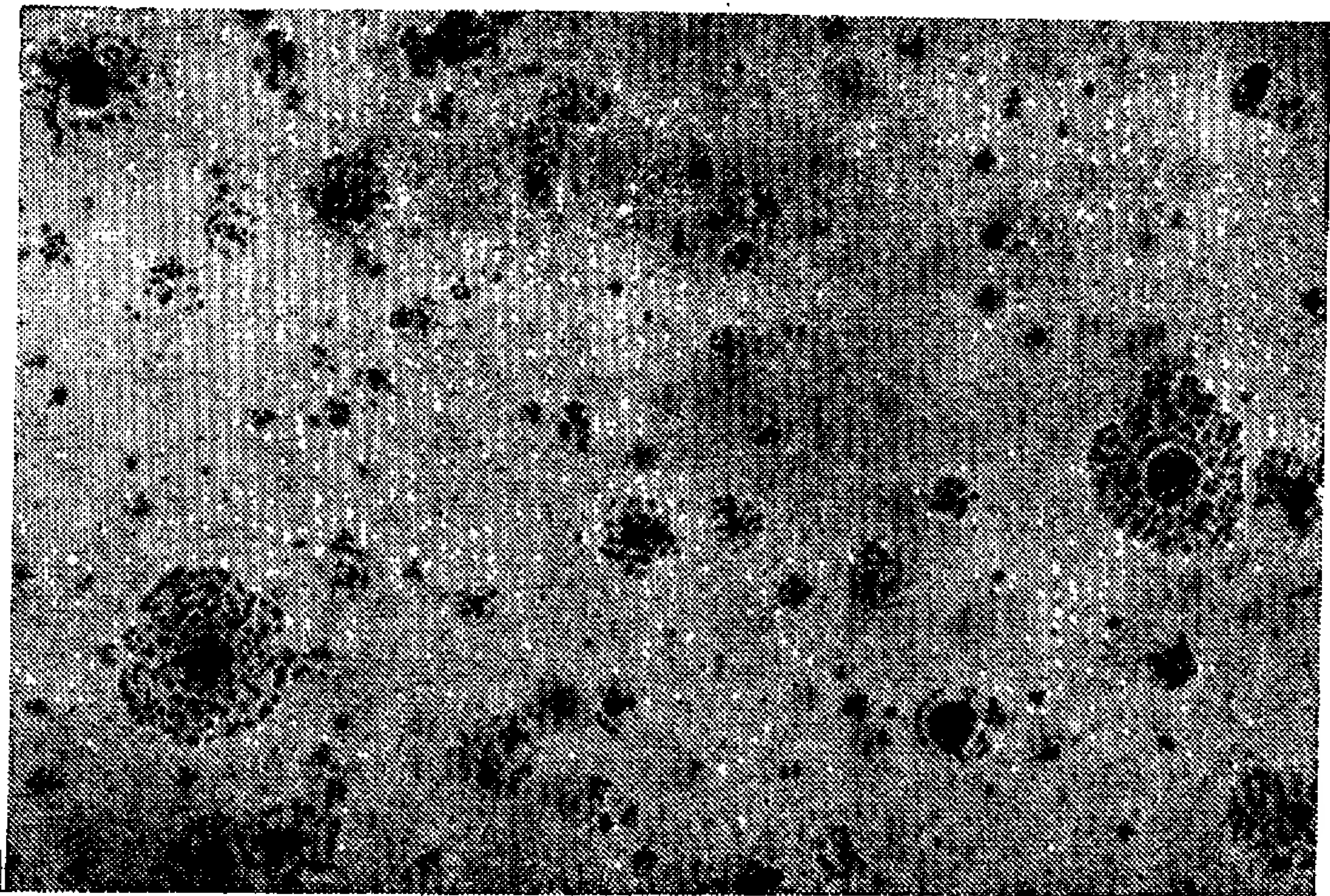


Рис. 9.1. Колонии *M. arginini*, растущие на PPLO-агаре.

грязнение. Источниками микоплазмы могут быть сыворотка животных, которая часто бывает загрязнена *A. laidlawii* и *M. arginini*, а также сами экспериментаторы, поскольку *M. hominis*, *M. pharyngis* и *M. salivarium* легко выделяются из полости рта и глотки человека.

Загрязнение культур клеток микоплазмой не всегда столь очевидно, как бактериальное загрязнение. В связи с этим важно 1) выявить действие микоплазмы на культивируемые клетки и 2) провести рутинные тесты на присутствие микоплазмы.

9.7.1. Влияние на культуры клеток

В какой-то степени эффекты, вызываемые микоплазмой, зависят от вида микоплазмы. Так, *M. gallisepticum* и *M. myccides* оказываются патогенными, а другие виды не вызывают гибели клеток, но тормозят рост культивируемых клеток. В ряде случаев эту способность тормозить рост можно объяснить дефицитом аргинина, обусловленным высокой активностью аргининдезаминазы у микроорганизмов, например у *M. hominis* (Kenny, Pollock, 1963; Kenny, 1973). Клетки *A. laidlawii* быстро расщепляют дезоксирибонуклеотиды.

9.7.2. Культуры микоплазм

Микоплазмы характеризуются потребностью к сложному составу питательной среды (Rodwell, 1969) и, следовательно, плохо растут в простых средах, таких, как среда Игла, пока в ней

не окажутся растущие животные клетки. Такая роль клеток частично обусловлена деградацией клеточной ДНК под влиянием секретируемых микоплазмой дезоксирибонуклеаз. Освобождающиеся при этом нуклеозиды являются для микоплазм незаменимым ростовым фактором (Stock, Gentry, 1971; Stambridge et al., 1971; Kenny, Pollock, 1963).

В связи с этим в тестах на присутствие микоплазмы следует применять обогащенные среды, например среды с дрожжевым экстрактом, обеспечивающим микоплазму всеми необходимыми компонентами. Кроме того, некоторые микоплазмы лучше растут в анаэробных условиях.

Для культивирования микоплазмы рекомендована также среда (Kenny, 1973) с соевым пептоном и диализованным экстрактом дрожжей (приложение 4). Включение в среду аргинина (16 м*М*) и 0,4 мг% фенолового красного может служить индикатором на аргининдезаминазу (по накоплению щелочи и соответствующему пурпурному окрашиванию). Инкубация с тритированным тимидином и последующее определение радиоактивного тимина в культуральной среде может служить тестом на тимидинфосфорилазу (House, Waddell, 1967).

В нашей лаборатории для микоплазмы используется более простая среда (Hayflick, 1965b).

— 70 частей 3%-ного экстракта мозга и сердца;
— 20 частей лошадиной сыворотки (прогретой при 56 °С в течение 30 мин);
— 10 частей автоклавированного диализованного или недиализованного дрожжевого экстракта.

В эту среду добавляют 0,5% глюкозы, аргинингидрохлорид и феноловый красный с пенициллином G (10 000 ед./мл) и ацетатом таллия 0,05%.

К 10 мл такой среды добавляют 1 мл суспензии животных клеток. Для диагностических целей выявление PPLO проводится, как правило, в PPLO-агаре (приложение 4).

Тест на PPLO. Забрать небольшое количество клеточной суспензии в пастеровскую пипетку. Коснуться пипеткой дубликатов пластинок с PPLO-агаром (около 10 раз каждой). Инкубировать пробирки с 5% CO_2 либо в азоте, либо в воздухе в закупоренном сосуде, т. е. либо в анаэробных, либо в аэробных условиях. Колонии появляются через 3—7 дней инкубации, но инкубация должна быть продолжена в течение 3 недель до появления типичной морфологии «вареных яиц» (рис. 9.1).

Дрожжевой экстракт, различные бульоны и агаровые среды поставляются фирмами Oxoid Ltd. или Difco Labs. (приложение 3).

9.8. Окрашивание микоплазмы

Раннее обнаружение микоплазм может иногда быть достигнуто при наблюдении монослоя зараженных клеток. Так, при окраске клеток гематоксилин-эозином можно наблюдать цитопатогенный эффект микоплазмы, выражающийся в появлении многочисленных темноокрашенных участков (гранул).

9.8.1. Окрашивание орсеином

Ниже приводятся детали метода выявления микоплазмы с помощью окрашивания орсеином (Fough, Fough, 1968).

— Высеять клетки на покровное стекло так, чтобы они не образовали полного монослоя в течение 48 ч.

— Поместить покровное стекло с клетками в чашку Петри, содержащую 3 мл 0,6%-ного цитрата натрия и медленно добавить 1 мл дистиллированной воды. Выдержать 10 мин и медленно добавить 4 мл фиксирующего раствора Карнуа (приложение 2). Слить жидкость и заменить ее 2 мл фиксирующего раствора Карнуа.

— Фиксировать 10 мин и затем высушить на воздухе в течение 5 мин. Окрашивать орсеиновым красителем (приложение 2) в течение 10 мин или более и промыть тремя сменами абсолютного спирта.

— Все операции проводить при комнатной температуре.

— Исследовать препараты в фазово-контрастном микроскопе. Инфицированные клетки содержат микоплазму преимущественно по периферии клеток, причем частично микоплазма ассоциирована с периферическими участками цитоплазмы, а частично расположена в межклеточном пространстве.

9.8.2. Радиоавтография

При радиоавтографическом исследовании зараженных микоплазмой клеток включение тритированного тимидина выявляется по всей клетке, а не только в клеточном ядре. Это происходит в результате деградации тимидина до тимина и включения последнего в ДНК микоплазмы и другие клеточные компоненты.

— Посеять клетки с плотностью $2{,}5 \cdot 10^4$ на чашку диаметром 35 мм. Предварительно в чашку поместить покровные стекла. Инкубировать культуру с ^{3}H-тимидином (5 мкКи на чашку) в течение 30—46 ч.

— Фиксировать клетки этанолом с уксусной кислотой (3 : 1) в течение 10 мин. Фиксацию повторить и промыть клетки двумя сменами абсолютного спирта.

— Смонтировать покровные стекла на предметные так, чтобы

клетки оказались сверху, и заключить в эмульсию (Ilford L4; разд. 12.4.4).

— Через 5—7 дней проявить в проявителе Kodak D19b и зафиксировать.

— Исследовать препараты в микроскопе. Клетки, лишенные PPLO, характеризуются выраженным концентрированием зерен серебра над ядрами, а на радиоавтографах зараженных клеток зерна серебра обнаруживаются преимущественно над цитоплазмой.

9.8.3. *Флуоресцентное окрашивание*

Присутствие ДНК микоплазмы в цитоплазме клеток может быть выявлено с помощью флуоресцирующего красителя Хехст 33 258 (приложение 3). Этот интеркалирующий краситель флуоресцирует при возбуждении ультрафиолетовым светом, что и лежит в основе очень быстрого и чувствительного теста на микоплазму.

Концентрат *бис*-бензамидного флуорохрома Хехст 33 258 готовят, растворяя 5 мг красителя в 100 мл ФСБ-А (приложение 1) на магнитной мешалке. Раствор может быть стерилизован фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. Его следует хранить в темноте при 4 °С. Перед использованием его следует разводить ФСБ-А в тысячу раз.

— Получить культуру тестируемых клеток на предметных стеклах и использовать, когда плотность клеток достигнет 50—70% полного монослоя.

— Отсосать среду и фиксировать клетки двумя сменами этанола с уксусной кислотой (3 : 1).

— Промыть деионизированной водой и инкубировать 30 мин при 37 °С с разбавленным *бис*-бензамидным флуорохромом.

— Ополоснуть деионизированной водой и смонтировать покровные стекла (клетками вниз) на предметных, используя глицериновую среду для заключения (22,2 мл 2,1%-ной лимонной кислоты, 1 л H_2O, 27,8 мл 2,8%-ного однозамещенного фосфата натрия и 50 мл глицерина, pH 5,5).

— Исследовать клетки во флуоресцентном микроскопе. В присутствии микоплазмы наблюдается флуоресценция цитоплазмы (рис. 9.2). Известен аналогичный метод окрашивания (Russel et al., 1975) с использованием 4,6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ).

— Промыть клетки ФСБ.

— Окрасить ДАФИ в концентрации 0,1 мкг/мл при 37 °С. После 15 мин инкубации окрашивание оказывается слабым, но флуоресценцию цитоплазмы легче выявить после кратковременной инкубации, чем после 60 мин инкубации, когда флуоресценция ядер становится интенсивной.

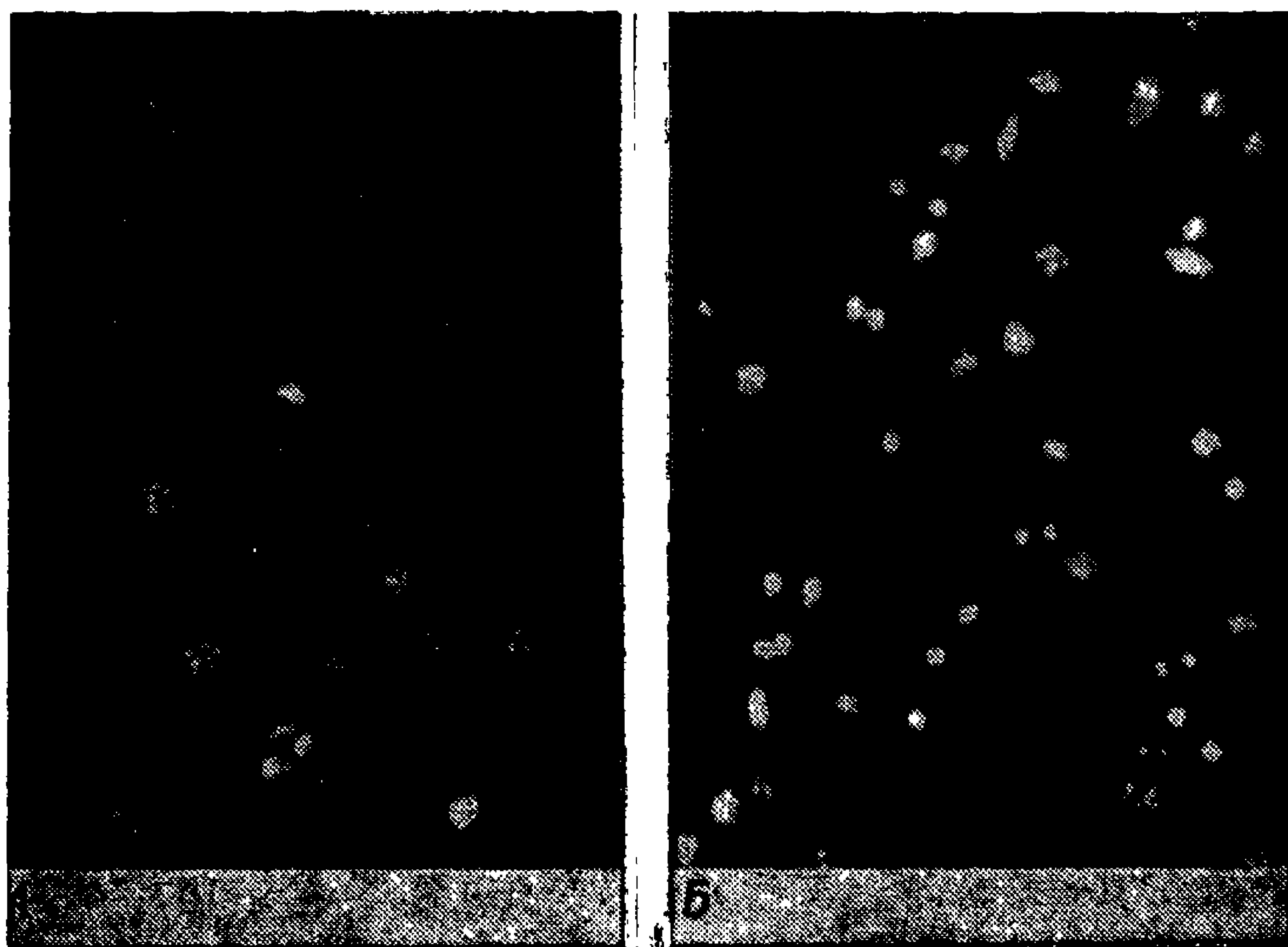


Рис. 9.2. Флуоресцентное окрашивание микоплазмы. Клетки окрашивали Хехст 33 258, флуоресцирующим в комплексе с ДНК. *А* — клетки 3Т6; можно видеть позитивное окрашивание цитоплазмы, особенно заметное в делящихся клетках. *Б* — не содержащие микоплазмы клетки PyY. [Содержащие микоплазму клетки 3Т6 любезно предоставлены доктором Льюисом из Flow Laboratories.]

— Промыть ФСБ и заключить клетки, как указано выше. Этот метод, использующий нефиксированные препараты, оказывается еще более быстрым, чем метод окрашивания Хехст 33 258. Готовый тест-набор с ДАФИ поставляется фирмой Bioassay Systems. Радиоавтография и методы окрашивания базируются на выявлении цитоплазматической ДНК (в первом случае реплицирующейся формы). По этой причине в контрольных препаратах всегда имеется небольшой фон, обусловленный митохондриальной ДНК, и тестируемые препараты должны сравниваться как с негативными, так и с позитивными контролями.

9.9. *Удаление микоплазмы*

В большинстве случаев загрязненные культуры следует автоклавировать, чтобы избежать распространения микоплазмы. Иногда загрязненными оказываются очень важные линии клеток, и для их очистки можно использовать канамицин (0,1 мг/мл), который подавляет рост некоторых микоплазм, не влияя на рост клеток (Fogh, Hacker, 1960). Антибиотик тилоцин

(6,0 мкг/мл) также оказывается эффективным против PPLO (каталог Gibco Biocult; приложение 3).

К настоящему времени можно сделать мало обобщений. Для подавления микоплазмы можно использовать смесь антибиотиков (Birskirk, 1967), причем было показано, что эффективность их действия вдвое увеличивается при повышении температуры инкубации до 41 °С (Johnson, Orlando, 1967).

Микоплазму можно удалить из клеточной культуры, обрабатывая ее иммунной сывороткой (Pollock, Kenny, 1963). Эффективным способом удаления микоплазмы из линии клеток, продуцирующих опухоли, часто оказывается пассирование этих клеток на животных.

9.10. Вирусное загрязнение

Сыворотка крупного рогатого скота может быть заражена различными вирусами (например, вирусом герпеса крупного рогатого скота, вирусом парагриппа 3), в связи с чем в настоящее время сыворотки постоянно тестируются производящими их фирмами на вирусное загрязнение. Эффективность такого скрининга в настоящее время подвергается сомнению (Kniazeff, 1973).

Вирусы можно также внести в культуру вместе с загрязненным трипсином, но главным источником вирусного загрязнения культуры оказываются сами клетки, и особенно первичные клетки. Поскольку многие виды животных могут страдать латентной вирусной инфекцией, не сопровождаемой явными симптомами, то и многие культуры первичных клеток могут нести в себе эти вирусы. Проблема усложняется еще и тем, что многие клетки первично получаются из опухолей, возникших в результате вирусной трансформации, а следовательно могут нести в себе весь вирусный геном или его часть в той или иной форме. Манипуляции с клетками при установлении первичной культуры могут привести к индукции вируса и соответствующему цитопатогенному эффекту. Проблема оказывается более серьезной, если видимого цитопатогенного эффекта не наблюдается, но вирус при этом продолжает реплицироваться с низкой скоростью или только в части клеток. Так, первичные культуры клеток от детей с лимфомой Бёркитта не обнаруживают никаких признаков присутствия вируса Эпштейна-Барр в течение нескольких пассажей, после чего некоторые клетки начинают обнаруживать положительную иммунофлуоресценцию (Henle, Henle, 1966).

Клетки, трансформированные паповавирусами, вирусом полиомы (клетки BHK21 PyY; Dulbecco, 1968) и SV 40 (клетки SV 28; Wiblin, Macphersson, 1972), содержат иммунореактивные вирусные антигены, но это не приводит к вредным для клеток

последствиям. Это, скорее, вызывает увеличение ростового потенциала и потерю чувствительности к окружающим клеткам.

Были получены температурно-чувствительные варианты клеток ВНК21 РуY, которые при непермиссивной температуре неспособны образовывать Т-антиген и ревертируют к нетрансформированному фенотипу (Dulbecco, 1969). Таким образом, экспрессия вирусных функций зависит от условий культивирования, и часто вирулентные вирусы могут быть «спасены» из непермиссивных зараженных клеток в результате слияния последних с незараженными пермиссивными клетками (Green, 1970). Аналогичное «спасение» in vitro может быть использовано для обнаружения криптических вирусов в непермиссивных клетках. Так, при добавлении гомогената подозреваемых клеток в культуру пермиссивных клеток или при инъекции гомогената пермиссивным хозяевам развитие цитопатогенного эффекта может свидетельствовать о наличии вируса в исследуемых клетках (Vigier, 1970).

Глава 10

Клеточный цикл

10.1. Описание

Растущие клетки характеризуются последовательностью или последовательностями событий, приводящих к удвоению их компонентов. Эти события происходят в строго упорядоченном по времени порядке, так что растущие клетки можно рассматривать как простую систему для изучения экспрессии генов. Два наиболее очевидных события в растущих клетках — это деление клетки и синтез ДНК. Эти события могут служить маркерами, характеризующими клеточный цикл (рис. 10.1).

М, или митоз, представляет собой период, когда клетки делятся, а S — период синтеза ДНК. G1 и G2 — промежуточные периоды (gaps), а точнее, пробелы в наших знаниях природы маркеров, характеризующих экспрессию генов в течение этих периодов. Многочисленные исследования в области клеточной биологии в последнее время направлены именно на заполнение этих пробелов. Символами G1, S, G2 и *М* обозначаются фазы клеточного цикла.

10.2. Митоз

Известны четыре стадии митоза: ***профаза, метафаза, анафаза*** и *телофаза*. Когда митоз начинается, клетка принимает форму шара, а ядро изменяет свой вид — первый видимый признак того, что клетка готова к делению. Это обусловлено конденсацией хромосом в ранней профазе — процесса, который продолжается по мере исчезновения ядерной мембраны, так что в метафазе высоко конденсированные хромосомы оказываются локализованными в центре клетки, напоминающей по своему виду шар. На этой стадии клетки лишь слабо прикреплены к субстрату, и их легко отделить встряхиванием или мягкой трипсинизацией (рис. 10.2). Это лежит в основе метода синхронизации путем отбора митотических клеток (разд. 11.2).

Центриоли мигрируют к противоположным полюсам клеток, и образуется митотическое веретено, соединяющее, по-видимому, клеточную мембрану через центриоли с центромерами каждой хромосомы[1]. Нити веретена состоят из одного типа

---

[1] Это только одна из гипотез об организации веретена в делящейся клетке. — *Прим. ред.*

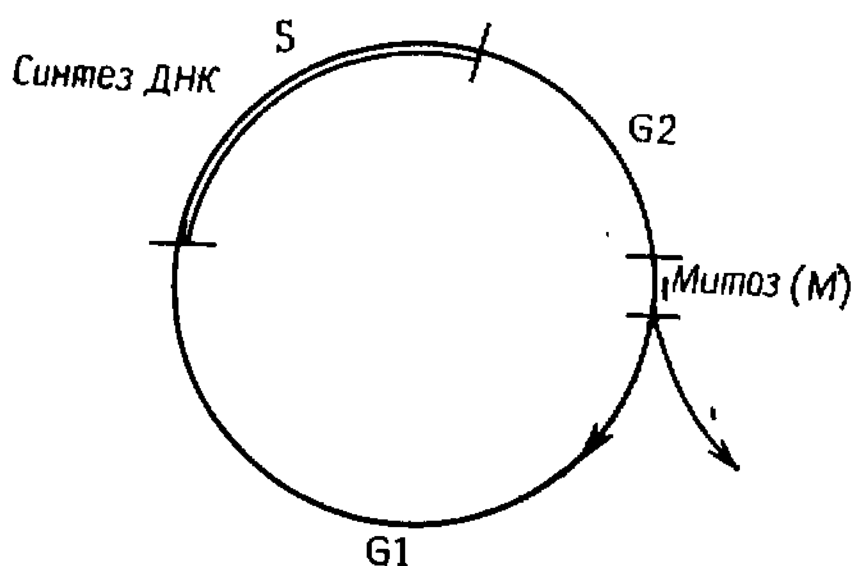


Рис. 10.1. Клеточный цикл. S-период синтеза ДНК. G1 и G2-интервалы между митозом (M) и S и между S и M соответственно.

белка, тубулина, с мол. массой 60 000. Именно организация этих молекул в митотическое веретено блокируется колхицином, колцемидом, винкристином и винбластином (рис. 10.3), что приводит к задержке митоза в метафазе.

В анафазе два набора хромосом под действием веретена движутся к противоположным полюсам клетки, а в телофазе хромосомы деконденсируются, по мере того как клеточная мембрана окружает каждую дочернюю клетку. Спаренные дочерние клетки вначале еще имеют шаровидную форму и в совокупности напоминают гантель. Вскоре, однако, они распластываются, в них восстанавливаются ядерная мембрана и ядрышки, и клетки входят в фазу G1.

10.3. Фаза S

Фаза S, как следует из ее названия (S-synthesis), — это период клеточного цикла, в течение которого происходит синтез ДНК. Не следует думать, что синтез ДНК в клетках начинается внезапно, протекает на полной скорости и затем столь же внезапно прекращается. На самом деле практически невозможно определить точное время начала и конца фазы S.

С помощью радиоавтографии нитей ДНК (Cairns, 1966, 1972) было показано, что синтез ДНК осуществляется внутри коротких отрезков, или *репликонов* (Huberman, Riggs, 1968). Репликоны варьируют по размеру от 15 до 60 мкм, но в большинстве культивируемых клеток длина репликона не превышает 30 мкм (см., однако, Callan, 1972). Синтез ДНК инициируется в середине репликона и продолжается в двух направлениях к его концам (Hand, Tamm, 1974). Позднее прилежащие репликоны сливаются, и две реплицированные хроматиды могут разделиться (Kowalski, Cheevers, 1976).

В начале фазы S синтез ДНК начинается в нескольких отдельных репликонах. Используя синхронизацию клеток путем

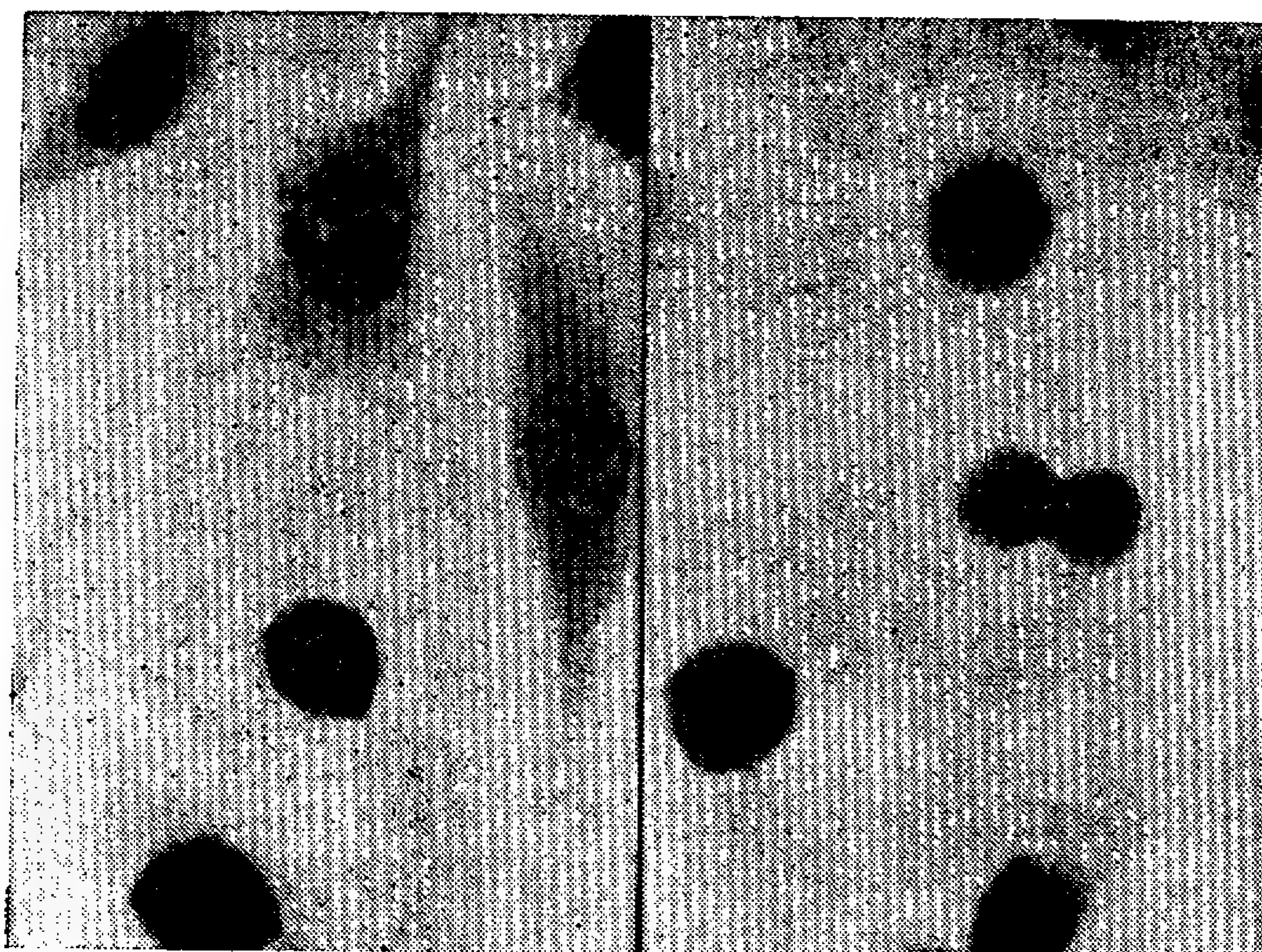


Рис. 10.2. Стадии митоза. Мышиные клетки L929 импульсно метили тритированным тимидином и готовили для радиоавтографического анализа. Помимо клеток в фазе S, покрытых гранулами серебра, видны клетки других стадий интерфазы и несколько митотических клеток. Можно различить метафазную клетку, две клетки в анафазе и поздней телофазе.

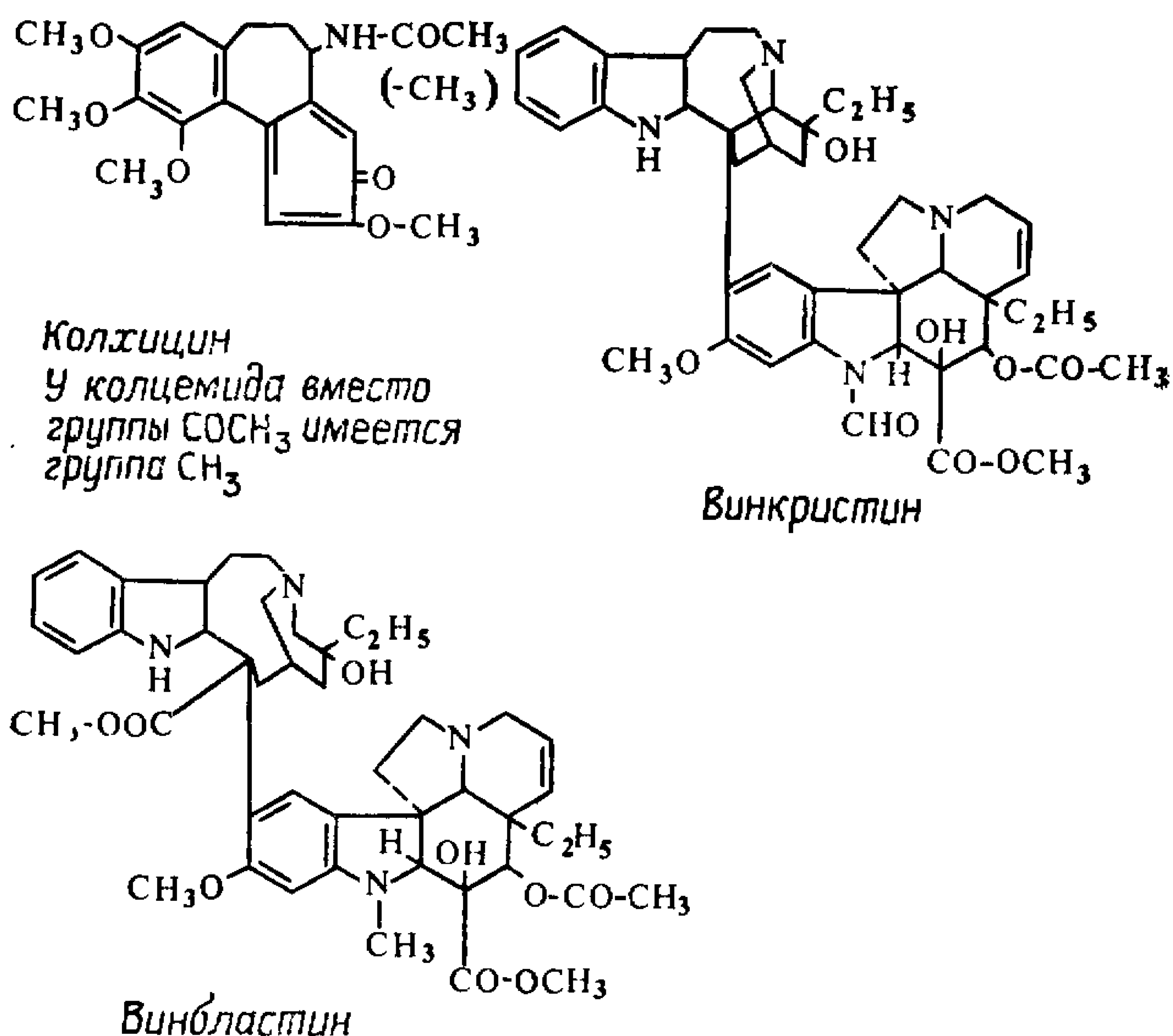


Рис. 10.3. Агенты, блокирующие митоз.

их остановки на границе фаз G1 и S с помощью аминоптериновой блокады (разд. 11.8), показали, что в начале фазы S всегда реплицируются одни и те же репликоны. Клетки выводили из аминоптериновой блокады в присутствии плотностной метки, например бромдезоксиуридина (Kajiwara, Mueller, 1964). Через 15 мин бромдезоксиуридин заменяли тимидином и давали клеткам расти в этих условиях в течение нескольких генераций. Затем клетки повторно синхронизировали и освобождали из аминоптериновой блокады в присутствии ^{3}H-тимидина. Было установлено, что метка вначале включается в ДНК с гибридной плотностью, т. е. содержащая бромдезоксиуридин ДНК реплицируется в начале фазы S.

В конце фазы S одна из X-хромосом клеток самок млекопитающих реплицируется позднее, чем остальные хромосомы клеток (Gilbert et al., 1965). Известно также, что отдельные участки генома, содержащие сателлитную ДНК, реплицируются в строго определенное время фазы S. Таким образом, существует специфическая временная упорядоченность репликации отдельных репликонов.

Наиболее четко это было показано при изучении синтеза ДНК путем импульсного мечения асинхронной популяции клеток тритированным тимидином и последующего радиоавтографического анализа включения метки в различные участки метафазных хромосом через различные интервалы времени после мечения (Stubblefield, Mueller, 1962).

При синхронизации клеток на границе фаз G1 и S и последующем снятии блока скорость синтеза ДНК вначале бывает низкой, затем увеличивается, достигая максимума к трем часам, и снижается в течение остальной части фазы S, т. е. в течение 6—7 ч (Stubblefield, Mueller, 1962; Adams, 1969b). В ходе репликации разное количество репликонов оказывается активным в то или иное время, и не удивительно, что при более тонком анализе выявляются «вспышки» включения тритированного тимидина в течение фазы S, а не постепенное изменение синтеза ДНК (Klevecz, 1969; Lett, Sun, 1970; Klevecz et al., 1974).

Детальный анализ с использованием различных методов (импульсное и постоянное мечение тритированным тимидином, флуоресценция ДНК при флуоресцентной реакции Фёльгена и микрофлуориметрия в протоке (Van Dilla et al., 1969), а также специфическая флуоресценция при реакции с диаминобензойной кислотой (Kissane, Robins, 1958) показывают, что содержание клеточной ДНК увеличивается скачкообразно и ранняя часть фазы S представляет собой период низкого синтеза ДНК, который при использовании недостаточно чувствительных методов измерений может быть ошибочно отнесен к фазе G1 (Klevecz et al., 1975).

10.4. Контроль клеточного цикла

У клеток в культуре и клеток в организме продолжительность фаз S, G2 и M оказывается одинаковой, а различия в продолжительности фазы G1 могут быть весьма ощутимыми, причем именно эти различия обусловливают различия в продолжительности клеточного цикла у разных типов клеток (табл. 10.1). Так, у культивируемых клеток легкого китайских хомячков фаза G1 практически отсутствует, и верхний предел продолжительности фазы G1 установить не удается (Robbins, Scharff, 1967). При слиянии клеток китайского хомячка, лишенных фазы G1, с клетками $G1^+$ (разд. 13.5) доминантным оказывается состояние $G1^-$ (Liskay, Prescott, 1978).

Клетки, которые длительное время пребывают в фазе G1, теряют некоторые ферменты, типичные для делящихся клеток, особенно ферменты, связанные с синтезом ДНК. О таких клетках принято говорить, что они «вне цикла», или в фазе G0. Введение понятия фазы G0 оправдано тем, что для выхода из фазы G0 клетке требуется воздействие определенных стимулов, обеспечивающих прохождение клетки через барьер и ее возвращение в цикл. Существует точка зрения (Pardee, 1974), что при субоптимальных физиологических условиях клетка входит в фазу покоя и что на протяжении фазы G1 существует один-единственный этап, на котором осуществляется регуляция возвращения клетки в очередной раунд клеточного цикла.

Известно много экспериментальных условий, при которых клетки входят в фазу G0 или выходят из нее, что дает возмож-

Таблица 10.1

Продолжительность фаз клеточного цикла в культивируемых клетках[1)]

Тип клеток	Продолжительность фаз, ч			
	T	*t*G1	*t*S	*t*G2
HeLa	20—28	8—16	5—9	2—8
Фибробласты человека	16—30	3—16	6—11	4—5
Амнион человека	19,4	9,8	6,7	2,2
Мышиные L-клетки	18—23	6—11	6—12	3—4
Мышиные клетки L5178	11,5	1,5	7,1	2,9
Фибробласты китайского хомячка	12—15	3—6	4—8	2—3

1) Результаты усреднены по данным из нескольких источников (Firket, 1965; Cleaver, 1967; Lipkin, 1971; Puck, 1972), чтобы дать представление о диапазоне изменения параметров цикла. Эти данные сравнимы с результатами измерения параметров клеточного цикла в клетках человеческого амниона (Sisken, Morasca, 1965) и в мышиных клетках L5178Y (Defendi, Manson, 1963). Митоз занимает очень малую часть цикла и его обычно включают в фазы *t*G1 или *t*G2. *T* представляет собой общую продолжительность клеточного цикла. *t*G1, *t*S и *t*G2 представляют собой продолжительности фаз G1, S и G2 соответственно. На рис. 10.1. представлена схема клеточного цикла.

ность изучать изменения, связанные с клеточной пролиферацией. Приведенные ниже примеры подробно рассматриваются в других разделах монографии.

1. Рост лимфоцитов может быть стимулирован митогенами (разд. 6.3).
2. Инкубированные без сыворотки клетки могут быть стимулированы добавлением сыворотки (Burk, 1970; разд. 11.6).
3. Клетки, прекратившие экспоненциальный рост и достигшие стационарной фазы вследствие ограничения поверхности, на которой они росли, могут быть стимулированы пересевом (Stoker, 1972; разд. 11.5).

Однако даже в популяции нерастущих клеток небольшое количество клеток способно к синтезу ДНК и делению. Можно думать, что хотя бо́льшая часть клеток находится в фазе G0, их малая часть стимулирована к пролиферации. В связи с этим возникает вопрос, зависит ли для данной клетки вероятность выхода из фазы G0 и вступления в цикл от продолжительности времени, прошедшего после предыдущего деления, или же все клетки в фазе G0 обладают равной вероятностью вступления в цикл? Последняя возможность наиболее убедительно обоснована в работах Смита и Мартина (Smith, Martin, 1973, 1974). Фазы клеточного цикла S, G2, M и часть фазы G1 Смит и Мартин рассматривают как единую фазу, получившую название фазы B. Предполагалось, что для каждого данного типа клеток продолжительность фазы B фиксирована в узких пределах. Вскоре после деления клетки попадают в состояние A, в котором не происходит продвижения клеток по циклу. Клетка может оставаться в состоянии A в течение неопределенного промежутка времени, причем всегда имеется фиксированная вероятность (P) перехода клетки в фазу B при постоянных внешних условиях. Смит и Мартин высказали предположение о том, что изменение этой вероятности перехода является главным фактором контроля пролиферации клеток.

В соответствии с моделью Смита и Мартина относительное количество клеток, остающихся в интерфазе (α), должно экспоненциально снижаться при увеличении возраста клеток, отсчитываемого с момента времени T_B после митоза. Следовательно, полулогарифмический график зависимости α от возраста клеток после митоза должен представлять собой прямую линию после лаг-периода, равного T_B. Как видно из рис. 10.4, экспериментальные данные подтверждают эту модель. Начальные изгибы внутрь перед линейными участками обусловлены вариабельностью T_B.

Существует другая модель, предсказывающая, что увеличение возраста клеток сопровождается увеличением вероятности деления, и на полулогарифмическом графике зависимости α от возраста это должно выражаться в постоянном изгибе кривой

внутрь. На практике различить эти две возможности очень трудно и вопрос о правильности той или иной модели контроля клеточной пролиферации до настоящего времени нельзя считать решенным (Baserga, 1978).

Инкубация лишенных сыворотки (разд. 11.6) клеток 3Т3 с сывороткой в течение увеличивающегося промежутка времени приводит к увеличению числа клеток, стимулированных к вступлению в фазу S. Существует точка зрения (Brooks, 1976) о том, что сыворотка определяет скорость вступления клеток в цикл благодаря созданию внешних условий, благоприятствующих высокой вероятности перехода. Для достижения этого увеличения вероятности требуется 14-часовой лаг-период, предшествующий вступлению клетки в фазу S. При удалении сыворотки вероятность вступления клеток в фазу B снижается, в связи с чем количество клеток, вступающих в фазу S, резко падает в течение 3—5 ч. Это говорит о том, что этап, на котором может произойти вхождение клеток в цикл, отстоит от начала фазы S не более чем на 5 ч.

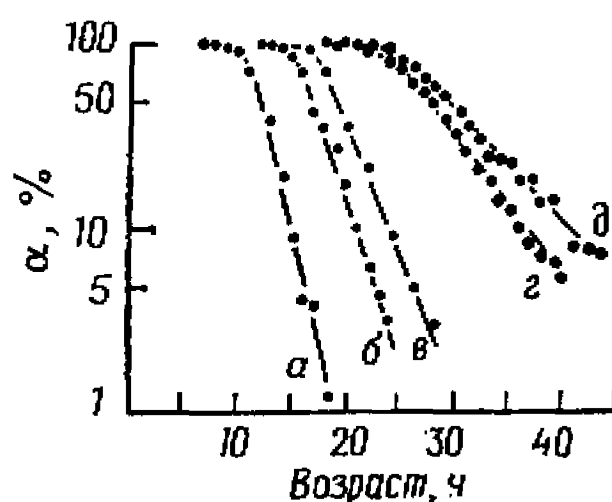


Рис. 10.4. Распределение времен генерации различных типов клеток в культуре. Относительное число клеток (α), остающихся в интерфазе в различные моменты времени после деления, определяли для различных клеток с помощью цейтраферной киносъемки. *а* — саркома крысы, *б* — клетки HeLa S3, *в* — фибробласты мыши, *г* — клетки L5, *д* — клетки HeLa. [Перепечатано с любезного разрешения авторов (Smith, Martin, 1973) и издателей.]

Смит и Мартин (Smith, Martin, 1974) добавляли 3 мМ гидроксимочевину (ингибитор синтеза ДНК; разд. 11.8.4) к обработанным сывороткой клеткам как раз перед тем, когда клетки должны были вступить в фазу S. Через 6 ч после удаления ингибитора клетки вступали в фазу S, но не все одновременно; скорость их вступления в фазу зависела от концентрации сыворотки. По мнению авторов, это свидетельствовало о постоянной зависимости вероятности перехода и указывало на то, что клетки в присутствии гидроксимочевины задерживаются в состоянии A и этап перехода локализован на границе фаз G1 и S.

Традиционная модель клеточного цикла объясняет разницу времен генерации между клетками в популяции как результат суммирования незначительных различий в продолжительности большого числа этапов, требующихся для прохождения клетки от одного деления до другого. В модели Смита и Мартина (Smith, Martin, 1973) такие различия также имеют место и обусловливают неоднородность длины фазы B, но главный вклад в различие времен генерации между клетками, согласно

их модели, вносят различия в продолжительности времени, проводимого клетками в состоянии А. Минор и Смит (Minor, Smith, 1974) показали, что различия в продолжительности фазы В между сестринскими клетками минимальны. Они обнаружили строгую корреляцию между межмитотическими временами дочерних клеток и общей вариабельностью времен генерации в популяции.

Маленькие и большие клетки из покоящейся культуры разделяли с помощью клеточного сортировщика с флуоресцентной активацией (разд. 10.7.5) и измеряли продолжительность их клеточного цикла (Shields et al., 1978). Клетки обоих размеров обладали одинаковой вероятностью выхода из состояния А, но у более мелких клеток G1-часть фазы В длилась дольше, чем у более крупных клеток. Эти результаты проще интерпретировать в рамках модели Смита и Мартина, чем в рамках традиционной модели с фазой G0.

10.5. Распределение клеток по циклу

На каждую клетку, вступающую в митоз в конце клеточного цикла, приходится две клетки, входящие в следующий цикл. Это означает, что распределение клеток по фазам цикла неравномерно и на стадии экспоненциального роста в культуре преобладают молодые клетки.

В идеальной ситуации все клетки популяции имеют одинаковое время генерации, описываемое функцией распределения

$$f(t) = kn_0e^{-kt},$$

где k — константа роста, n_0 — число клеток в момент времени нуль и t — время, выраженное в долях времени генерации, т. е. изменяющееся от 0 до 1.

Это выражение может быть приведено к основанию 2:

$$f(t) = n_0 2^{-t}.$$

Таково идеальное распределение клеток вдоль клеточного цикла, показанное прямой линией на рис. 10.5 (Engleberg, 1961; Kubitschek, 1966).

Практически из-за вариабельности времени генерации ситуация более точно отражается пунктирной линией (рис. 10.5) (Sisken, Morasca, 1965).

Если не все клетки имеют одно и то же время генерации, то время, необходимое для удвоения числа клеток (T_D), оказывается несколько ниже, чем время генерации (T). И, с другой стороны, если не все клетки популяции делятся, т. е. если пролиферативный пул ниже 1 (см. ниже), то T_D будет больше, чем T.

Количество клеток в начале фазы G1 будет вдвое выше,

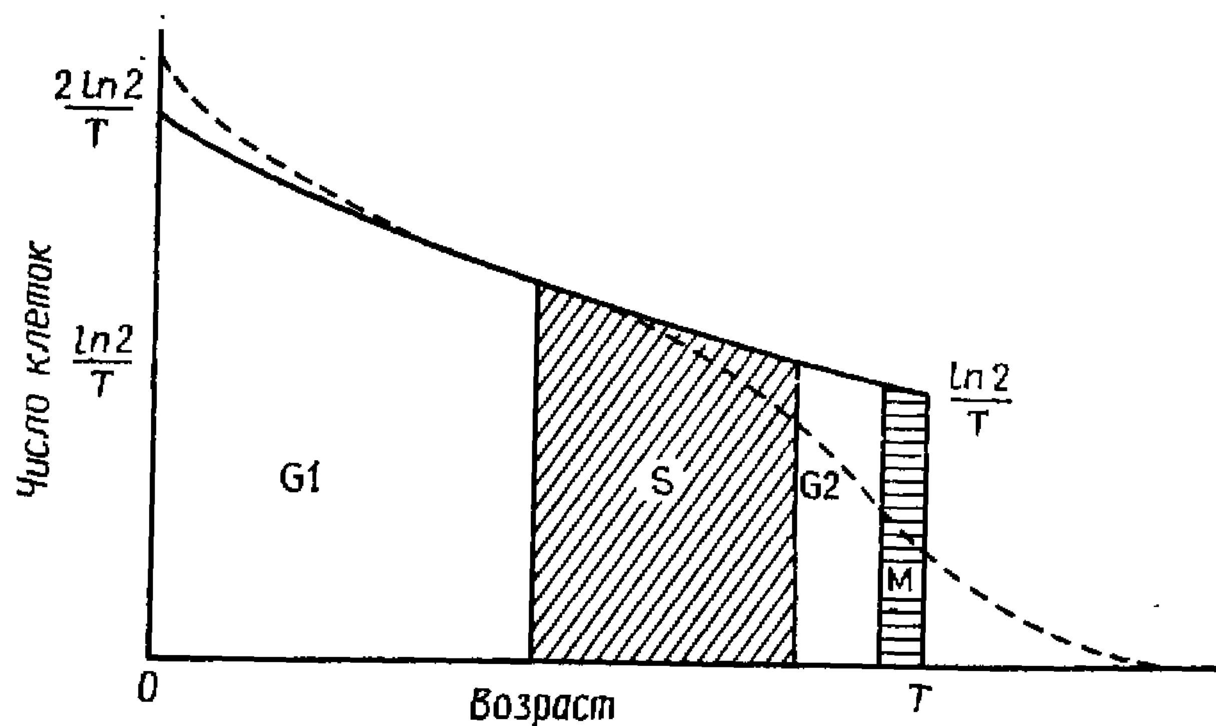


Рис. 10.5. Распределение экспоненциально растущих клеток в клеточном цикле. Теоретическое распределение экспоненциально растущих клеток в клеточном цикле показано сплошной линией. Однако поскольку продолжительность клеточного цикла у индивидуальных клеток несколько варьирует, то реальное распределение более точно выражается пунктирной линией. Сразу после деления клетки имеют нулевой возраст, а ко времени следующего митоза их возраст становится равным T. Положение фаз G1, S и G2 соответствует таковому для типичной клетки. [Перепечатано с любезного разрешения автора (Cleaver, 1967).]

чем в конце фазы G2. Такие же, но менее выраженные различия существуют между числом клеток в начале и в конце фазы S. Более того, относительное число клеток в фазе S зависит не только от относительной продолжительности фазы S и от времени генерации, но также и от положения фазы S в клеточном цикле (см., однако, «пролиферативный пул», ниже). Следовательно, неверным будет не только утверждение о том, что если 30% клеток находится в фазе S (индекс метки ИМ= =0,3), то продолжительность фазы S (tS) составляет 30% времени генерации, но даже зависимость

$$\text{ИМ} = \ln \frac{2^{tS}}{T}$$

также является неверной. Чтобы связать tS с ИМ, следует выяснить положение фазы S внутри клеточного цикла, соотнеся его с T и tG2. В конечном счете мы придем к выражению

$$\text{ИМ} = \left[\exp t\text{S} - \ln \frac{2}{T} - 1\right] \exp t\text{G2} \ln \frac{2}{T}$$

(Cleaver, 1965).

Положение митоза в клеточном цикле фиксировано, и его продолжительность невелика. Зависимость между митотическим индексом (МИ) и T выражается следующей формулой:

$$\text{МИ} = \ln \frac{2^{tM}}{T}$$

(Smith, Dendy, 1962).

Поскольку клетки в фазе G1 обладают одинарным набором ДНК, а клетки в фазе G2 — двойным набором ДНК, то в культуре экспоненциально растущих клеток среднее содержание ДНК на клетку будет в 1,3 раза выше, чем в клетках, находящихся в фазе G1.

10.6. Пролиферативный пул

В большинстве клеточных популяций не все клетки размножаются, какая-то часть клеток не пролиферирует. Эти клетки можно рассматривать как клетки, находящиеся в фазе G0 или в состоянии A. Величина фракции растущих клеток, или пролиферативного пула, описывается выражением

$$\frac{N_c}{N} = \frac{\text{Число пролиферирующих клеток}}{\text{Общее число клеток}}.$$

Время, потребное для удвоения общего числа клеток в такой культуре, не равно времени клеточного цикла или времени генерации. В связи с этим представляется важным, чтобы при исследовании клеточного цикла проводилось различие между T_D и T и величина пролиферативного пула поддерживалась как можно более высокой.

Низкий пролиферативный пул — явление обычное in vivo (даже у некоторых опухолей пролиферативный пул может быть ниже 0,1), но и in vitro в первичных культурах клеток или в культурах, растущих в субоптимальных условиях, зачастую делятся не все клетки. Снижение пролиферативного пула может происходить вследствие 1) необратимой дифференцировки, 2) вступления клеток в фазу G0 или в состояние A, 3) гибели клеток.

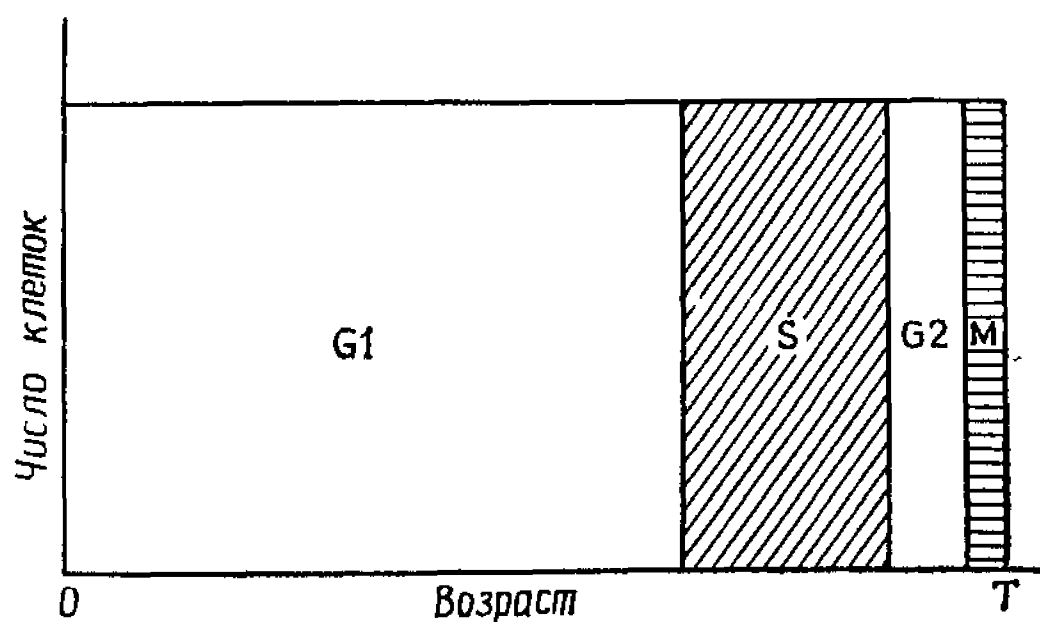


Рис. 10.6. Равновесное распределение клеток по клеточному циклу. При равновесии число клеток, возникающих благодаря клеточному делению, оказывается в точности равным числу клеток, теряющихся в результате гибели или миграции, так что общее число клеток в той или иной фазе цикла оказывается пропорциональным продолжительности этой фазы.

В стационарном состоянии, когда увеличение числа клеток в результате деления уравновешивается потерей части клеток из популяции, распределение клеток по фазам оказывается прямоугольным (рис. 10.6) и относительное количество клеток в той или иной фазе становится прямо пропорциональным относительной продолжительности этой фазы, т. е.

$$\text{Митотический индекс (МИ)} = tM/T.$$

Более подробную информацию о кинетике клеточного цикла можно найти в соответствующих монографиях (Cleaver, 1967; Aherne et al., 1977).

10.7. Анализ клеточного цикла

10.7.1. Метод импульсного включения тритированного тимидина (Howard, Pelc, 1953)

Этот метод наиболее прост, и приведенное ниже описание предназначено для клеток, растущих в маленьких чашках или на покровных стеклах. Метод может быть модифицирован для применения в суспензионных культурах.

— Установить серию покровных стекол в многолуночные пластинки (разд. 2.2). На один опыт требуется не менее 48 стекол, т. е. 2 многолуночных пластинки. В каждую лунку высеять $1 \cdot 10^4$—$2 \cdot 10^4$ клеток в 0,5 мл среды. Клетки инкубировать в течение ночи для достижения фазы экспоненциального роста. Предпочтительно использовать среду с буфером Hepes, поскольку периодический отбор стекол с клетками затрудняет поддержание pH с помощью бикарбонатного буфера. Важно также не допускать падения температуры при отборе стекол с клетками, в связи с чем эту операцию лучше проводить в термостатированной комнате (при 37 °С).

— Инкубировать каждую культуру с ^{3}H-тимидином в течение 30 мин (5 мкКи/мл; 2 Ки/ммоль). Для этого в каждую лунку, содержащую 0,5 мл среды, добавить 10 мкл раствора, содержащего 2,5 мкКи ^{3}H-тимидина в концентрации $1{,}25 \cdot 10^{-4}$ М.

— Удалить среду, содержащую ^{3}H-тимидин, используя для этой цели пастеровскую пипетку, соединенную через ловушку с вакуумным насосом. Быстро добавить в лунки прогретую среду с немеченым тимидином ($2 \cdot 10^{-6}$ М).

— Фиксировать покровные стекла через равные интервалы времени (20—30 мин), последовательно ополаскивая стекла в ФСБ (дважды), в 5%-ной холодной ТХУ (4 раза) и абсолютном этаноле (дважды). Приклеить покровные стекла к предметному, используя DePeX (Pearse, 1953) и подготовить препараты для радиоавтографии (см. разд. 12.4).

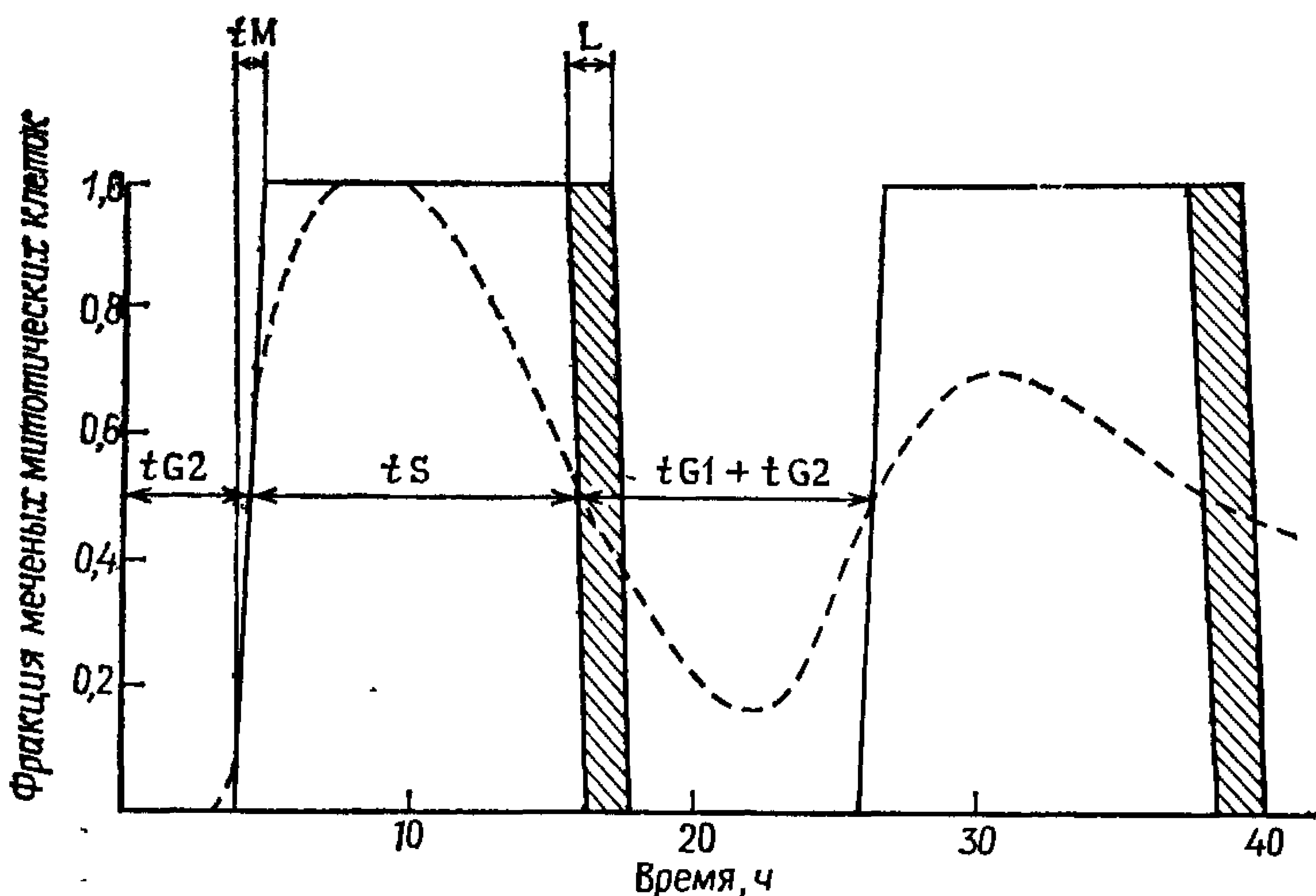


Рис. 10.7. Фракция меченых митотических клеток. Сплошной линией обозначена теоретическая кривая изменения фракции митотических клеток после мечения их в течение 100 мин тритированным тимидином. Пунктирной линией обозначены результаты, полученные с мышиными L-клетками. Заштрихованными участками показана продолжительность инкубации клеток с тритированным тимидином. [Перепечатано с любезного разрешения автора (Cleaver, 1967).]

DePeX производится фирмой G. T. Gurr Ltd. (приложение 3).

— На радиоавтографах подсчитать относительное количество меченых митотических клеток. Теоретически первые меченые митотические клетки должны появляться после промежутка времени, равного продолжительности фазы G2 (*t*G2), и количество меченых митотических клеток должно увеличиваться до 100% в течение *t*M (рис. 10.7). В течение *t*S относительное содержание меченых митозов должно снижаться, и новое появление меченых митозов должно иметь место после интервала времени, равного сумме *t*G1 и *t*G2.

На практике из-за различий между клетками и из-за трудностей, связанных с кратковременной (импульсной) меткой, границы между этими событиями оказываются размытыми. При использовании 50%-ных значений для обозначения границ переходов можно получить разумные приближения к истинным значениям продолжительностей различных фаз клеточного цикла.

10.7.2. Метод непрерывного мечения

— Высеять и инкубировать клетки с ^{3}H-тимидином, как указано выше, с той лишь разницей, что концентрация тимидина должна быть равной 2,5 мкКи/мл (0,06 Ки/ммоль).

— Не удалять среду с тритированным тимидином и в ходе инкубации через определенные интервалы отбирать клетки.

— Подготовить препараты для радиоавтографического анализа и подсчитать относительное количество меченых митозов, относительное количество меченых клеток и среднее число зерен серебра над клетками (рис. 10.8).

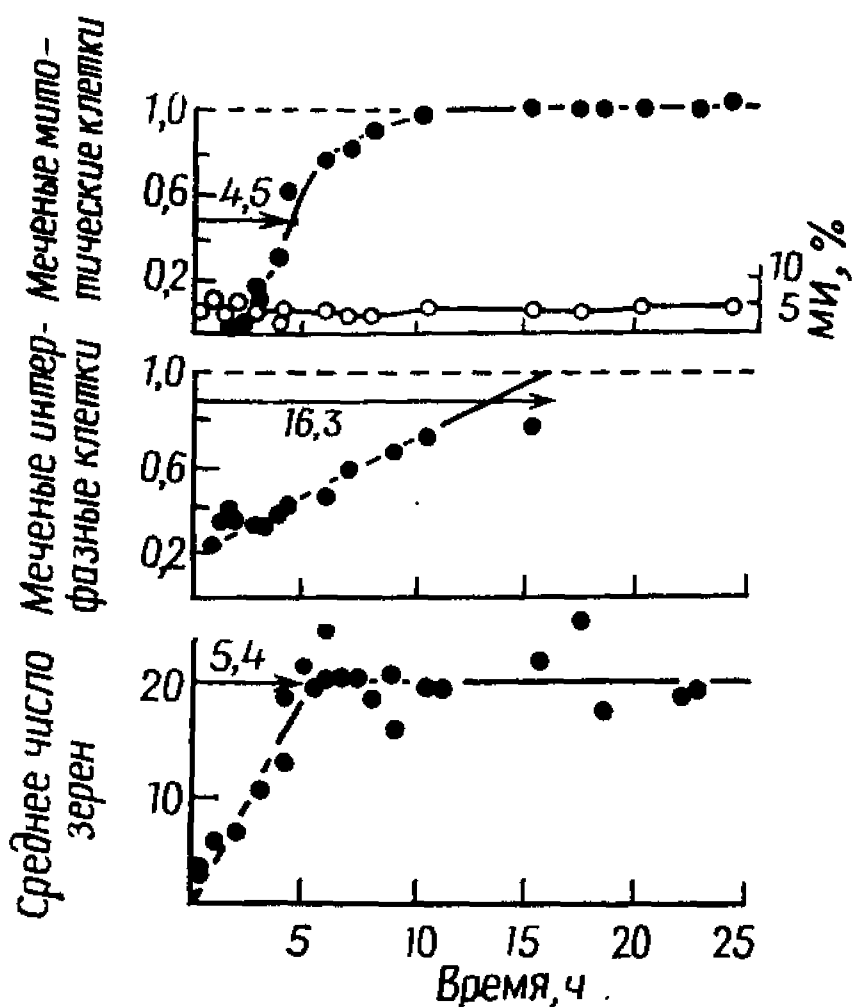


Рис. 10.8. Метод непрерывного мечения. Культуры эпителиальных клеток кожи человека непрерывно инкубировали с тритированным тимидином (2,5 мкКи/мл; 0,06 Ки/моль) в течение 25 ч и в течение этого времени отбирали клетки для подсчета указанных параметров. [Перепечатано с любезного разрешения автора (Cleaver, 1967).]

Относительное количество меченых клеток достигает 1,0 только после того, как все клетки, не находящиеся первоначально в фазе S, пройдут весь цикл и достигнут фазы S, т. е. после времени T—*t*S, которое в данном случае (рис. 10.8) составляет 16,3 ч и состоит из *t*G1+*t*G2+*t*M. Величина *t*G2, как и в предыдущем случае, представляет собой время, необходимое для появления первого меченого митоза. Величина *t*G1 может быть рассчитана по величине митотического индекса (относительного количества митотических клеток):

$$\text{МИ} = t_n \ln \frac{2}{T}$$

(Smith, Dendy, 1962).

Число зерен серебра над клеткой достигает постоянного уровня, когда клетки проходят всю фазу S в присутствии ^{3}H-тимидина. Однако при делении таких клеток метка распределяется между дочерними клетками, и число зерен серебра над клеткой падает. Это вносит ошибку в определяемое значение *t*S. Ошибки вносятся также из-за того, что в моменты внесения тритированного тимидина или сбора клеток часть клеток находится в фазе S. Таким образом, этот метод дает завышенную оценку значения *t*S.

10.7.3. *Функции накопления*

Некоторую информацию можно получить, изучая накопление митотических клеток при добавлении агентов, блокирующих митоз. Культуры устанавливались, как указывалось выше, и в нулевой момент времени в культуры добавляли колцемид (0,25 мкг/мл).

На рис. 10.9 показано, что после короткого лаг-периода зависимость функции накопления [$\lg(1+Nm)$, где Nm представ-

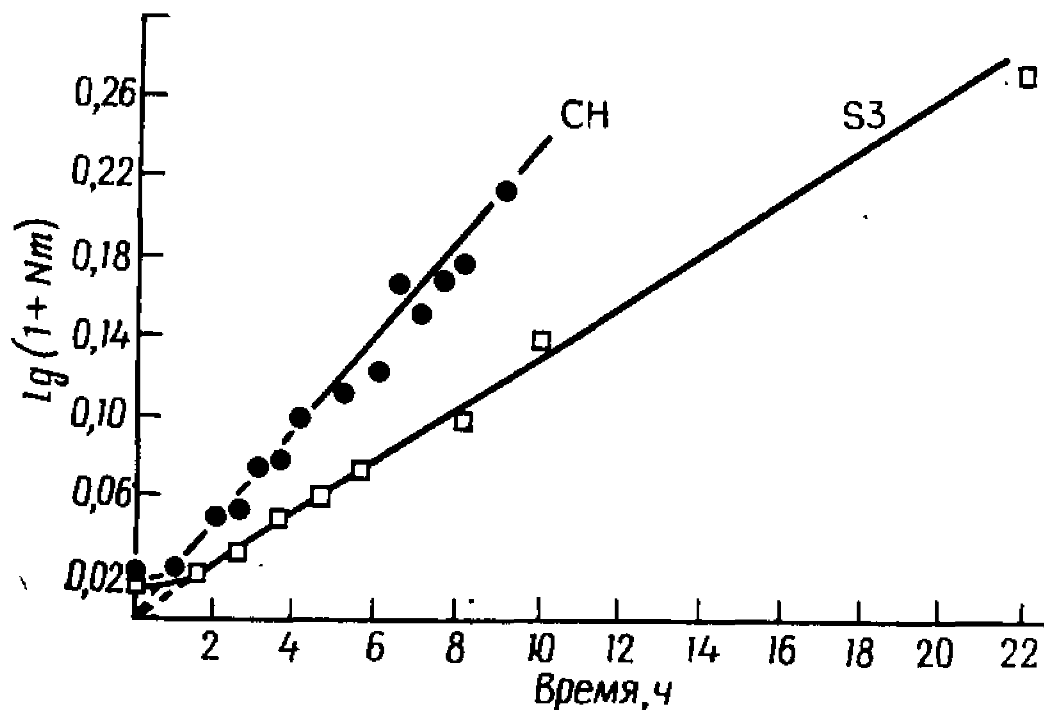


Рис. 10.9. Накопление митотических клеток. Показана зависимость функции накопления митотических клеток $\lg(1+Nm)$ от времени для клеток китайского хомячка ($T=12{,}4$ ч) и клеток HeLa ($T=20{,}1$ ч), к которым в нулевое время добавляли колцемид. [Перепечатано с любезного разрешения автора (Puck, 1964) и издателей.]

ляет собой относительное количество митотических клеток] от времени становится линейной. Пользуясь этим графиком, можно вычислить время генерации (T), либо используя уравнение

$$\lg(1+Nm)=0{,}301tM+t/T,$$

где tM — продолжительность митоза, а t — время после добавления колцемида, либо определяя время, в течение которого функция накопления достигнет значения 0,3. Характер экспериментальных кривых часто не соответствует этому теоретическому представлению. Это обусловлено тем, что 1) время генерации варьирует от клетки к клетке, 2) жизнеспособными могут оказаться не все 100% клеток, 3) часть клеток может избежать действия колцемида и вступить в фазу G1 и 4) колцемид может оказать действие на другие фазы клеточного цикла и тем самым изменить время генерации. Лаг-период в скорости накопления митотических клеток, наблюдаемый сразу после добавления колцемида, объясняется тем, что часть клеток при добавлении препарата уже находится в митозе; эти клетки не блокируются, а заканчивают митоз и входят в фазу

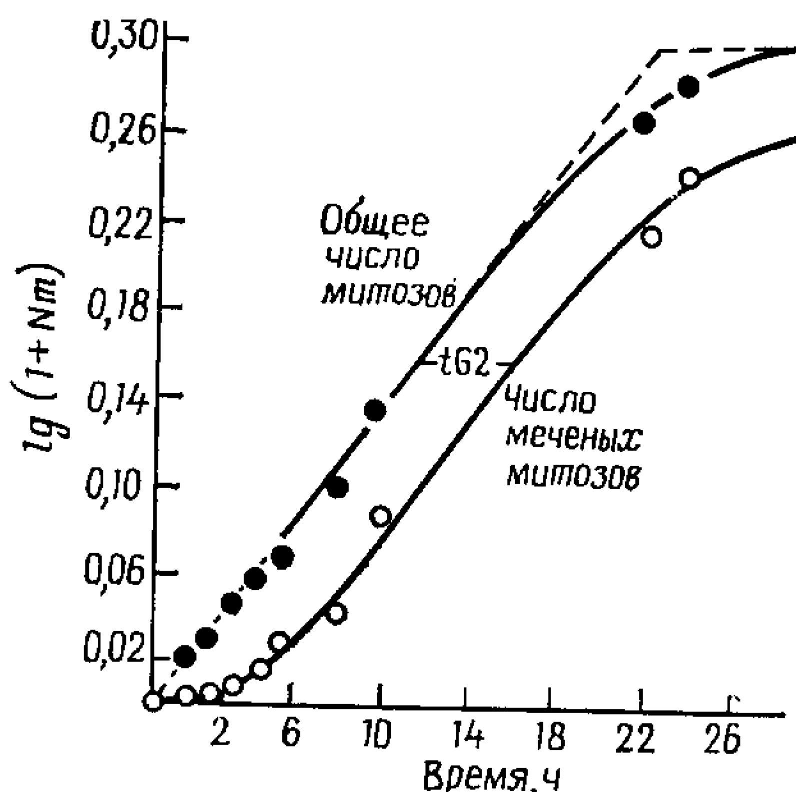


Рис. 10.10. Накопление меченых митотических клеток. Эксперимент с клетками HeLa S3, аналогичный отображенному на рис. 10.9, но в данном случае в нулевой момент времени вместе с колцемидом был добавлен ^{3}H-тимидин. После начального лаг-периода кривая накопления всех митотических клеток проходит параллельно кривой накопления меченых митотических клеток и расстояние между ними соответствует продолжительности фазы G2 [Перепечатано с любезного разрешения авторов (Puck, Steffen, 1963) и издателей.]

G1. Тэйлор (Taylor, 1965) показал, что такая ситуация имеет место при использовании родственного алкалоида, колхицина, в концентрации между 50 и 200 н*М*, но при концентрациях выше 200 н*М* все клетки блокируются в митозе.

Если одновременно с колцемидом в культуры добавлять тритированный тимидин, то можно построить три кривые накопления: а) общего накопления меченых клеток, б) общего накопления митозов и в) накопления меченых митозов. На основании этих трех кривых можно вычислить продолжительность фаз S и G2, а следовательно, и фазы G1.

Как показано на рисунке 10.10, расстояние между кривыми дает точное значение продолжительности фазы G2. Если популяция клеток находилась на стадии экспоненциального роста и тритированный тимидин не оказывал повреждающего действия на клетки, то кривые на рис. 10.10 должны быть параллельны. Значение времени генерации может быть получено из угла наклона этих кривых, который равен $0{,}3/T$.

Используя полученное значение продолжительности фазы G2, можно построить график (рис. 10.11) зависимости $\lg(1+\frac{N(L)}{k})$ от времени, где $N(L)$ — доля меченых клеток, а $k=\exp\,(\ln 2\,\frac{tG2}{T})$ (Puck, Steffen, 1963; Puck et al., 1964). Эта функция достигает плато, когда все клетки из фазы G1 переходят в фазу S или (при промежуточных концентрациях колцемида) все клетки из фаз M и G1 переходят в фазу S. Поскольку продолжительность фазы G1 в клеточной популяции значительно варьирует, то переход кривой в плато оказывается сглаженным. Поэтому следует проводить прямую линию через точки, полученные в течение первых 6 ч (или около этого) эксперимента. Далее следует найти точку пересечения этой прямой с линией, проведенной параллельно оси абсцисс на уровне, соот-

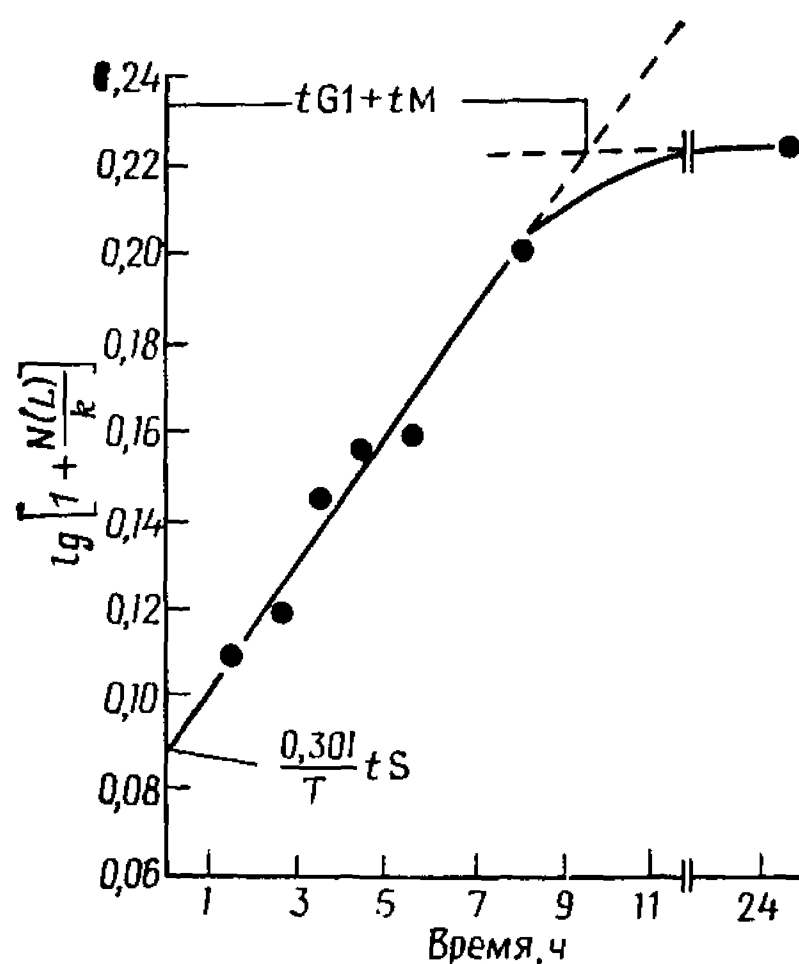


Рис. 10.11. Накопление меченых клеток. Экспериментальные точки на этом графике могут быть получены из эксперимента, приведенного на рис. 10.10. По оси ординат отложена функция накопления $\lg[1+N(L)/k]$, где $N(L)$ — общее число меченых клеток, а $k=2^{t\text{G2}}$. [Перепечатано с любезного разрешения авторов (Puck, Steffen, 1963) и издателей.]

ветствующем значению функции через 24 ч после начала эксперимента. Пересечение экспериментальной прямой с осью ординат ($0{,}3t\text{S}/T$) может быть использовано для вычисления продолжительности фазы S.

Хотя в основе этого метода лежат более сложные математические вычисления, чем в случаях ранее рассмотренных методов [более подробно об этом см. в монографии Клевера (Cleaver, 1967)], при его применении требуется меньше экспериментальных точек, получаемых в течение более короткого промежутка времени.

10.7.4. Графический анализ

Наиболее простой метод анализа клеточного цикла предложил Окада (Okada, 1967). Этот метод помимо оценки продолжительности фаз клеточного цикла позволяет получить дополнительную информацию о количественном распределении клеток по фазам цикла.

Для применения этого метода требуется следующая информация о клетках экспоненциально растущей культуры.

А. Время генерации, которое либо может быть определено как время удвоения клеток, либо вычислено по функции накопления (разд. 10.7.3).

Б. Митотический индекс (разд. 10.5).

В. Относительное количество клеток в фазе S, вычисленное при импульсном мечении клеток ^{3}H-тимидином (разд. 10.7.1).

Г. Продолжительность фазы G2, установленная либо путем

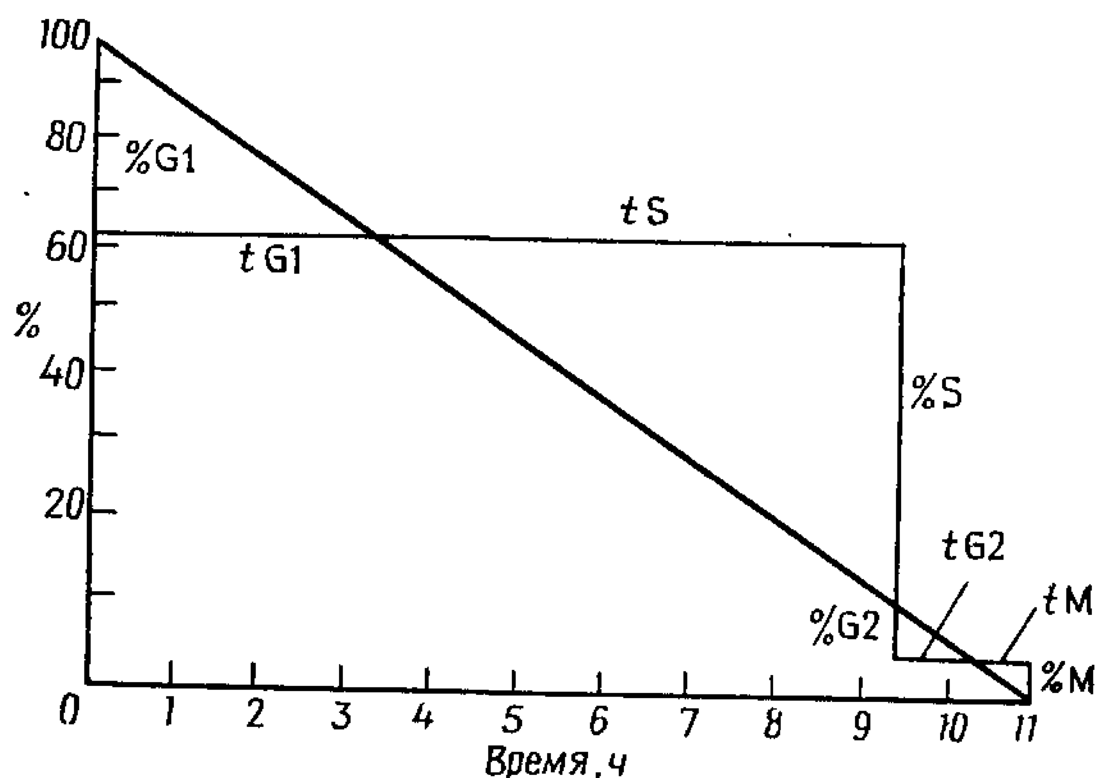


Рис. 10.12. Графический анализ клеточного цикла. Культуры клеток комара *Aedes albopticus* в чашках Петри диаметром 5 см регулярно анализировали для установления продолжительности времени удвоения (принимаемого за время генерации). После установления экспоненциального роста культуры к клеткам добавляли ^{3}H-тимидин и колцемид и клетки продолжали инкубировать для определения процента меченых клеток, митотического индекса и *t*G2. Способ построения графика указан в тексте (см. разд. 10.7,4).

оценки промежутка времени между добавлением ^{3}Н-тимидина и появлением меченых митотических клеток, либо по расстоянию между кривыми на рис. 10.10.

Эксперименты для получения всей этой информации занимают 3—4 ч с использованием и без использования колцемида. Затем на полулогарифмической миллиметровой бумаге строят следующую диаграмму (рис. 10.12).

— Отложить время генерации на линейной оси, а на логарифмической оси разделить участок между 1 и 2 на 100 делений (100%) так, чтобы точка 1 совпала с 0%, а точка 2 — с 100%. Соединить прямой линией точки *T* и 100%.

— Из точки *T* (соответствующей 11 ч) провести вертикальную линию, длина которой соответствовала бы относительному количеству клеток в митозе, и через конец этого отрезка провести прямую, параллельную оси абсцисс. Длина этой прямой до пересечения с диагональной линией дает продолжительность фазы M.

— Продолжить горизонтальную линию на расстояние, равное продолжительности фазы G2, и конец отрезка соединить вертикальной линией с диагональной прямой. Это расстояние соответствует относительному количеству клеток в фазе G2.

— Продолжить вертикальную линию на расстояние, равное относительному количеству клеток в фазе S, и конец отрезка

соединить горизонтальной линией с диагональной прямой. Это расстояние соответствует продолжительности фазы S.
— Два последних отрезка (горизонтальный и вертикальный) соответствуют продолжительности фазы G1 и относительному количеству клеток в фазе G1.

10.7.5. Проточная микрофлуориметрия

Установка, разработанная в Лос-Аламосской научной лаборатории, позволяет проводить анализ большого количества одиночных клеток относительно содержания в них ДНК и белка, клеточного объема и т. д. (Fulwyler, 1965; Kraemer et al., 1973; Klevecz et al., 1975; Herzenberg et al., 1976). На выходе прибора могут быть получены такие параметры большой популяции клеток, как распределение клеток по содержанию ДНК, по размеру клеток и т. п. Помимо возможности такого комплексного анализа установка обеспечивает физическое разделение клеток на субпопуляции по тому или иному интересующему исследователя параметру.

Клетки окрашиваются флуоресцирующим красителем, специфическим для отдельных клеточных компонентов (может быть использован бромид этидия в концентрации 0,1 мг/мл для окраски ДНК или флуоресцирующие антитела). Анализ окрашенных клеток производится по мере их прохождения одна за другой через сенсорное устройство. Так, при прохождении клетками расположенного перпендикулярно луча аргонового лазера (время прохождения 2—3 мкс) каждая клетка дает вспышку флуоресценции, которая может быть проанализирована как по интенсивности, так и по цвету. Кроме того, сигнал, соответствующий клеточному объему, может генерироваться путем установки диафрагмы счетчика Коултера на пути прохождения клеток либо, что проще, путем измерения рассеянного света вторым фотоумножителем, установленным под прямым углом к лазерному лучу. Информация, полученная в результате измерения флуоресценции клеток и светорассеяния, позволяет воссоздать трехмерную картину числа клеток, их объема и содержания в них ДНК.

Сортировка клеток осуществляется путем преобразования непрерывного тока жидкости с клетками в капли, причем 1% капель содержит по одной клетке. Капли формируются и проходят между заряженными пластинами через определенное время после анализа клеток. Клетки, представляющие интерес для исследователя (например, содержащие ДНК в количестве, характерном для фазы G2), могут быть отобраны путем внесения в поток клеток заряда на короткое время, достаточное

для того, чтобы три капли (средняя из которых содержит интересующую исследователя клетку) при прохождении между электродами отклонились в отдельную собирающую пробирку.

В качестве примера рассмотрим результаты эксперимента, в котором клетки СНО, импульсно меченные ^{3}H-тимидином, были окрашены бромидом этидия или с помощью флуоресцентной (с акрифлавином) модификации метода Фёльгена (метод специфической окраски ДНК) и использованы для микрофлуориметрического анализа в протоке и сортирования клеток. На рис. 10.13 приведены результаты определения распределения клеток по содержанию ДНК. Около 61% клеток содержат ДНК в количестве, характерном для клеток в фазе G1, и около 16,3% клеток содержат диплоидное количество ДНК, характерное для клеток в фазах G2 и M. Остальные 23% клеток содержат промежуточное количество ДНК. Было использовано уравнение, предложенное Леннартцем и Маурером (Lennartz, Maurer, 1964):

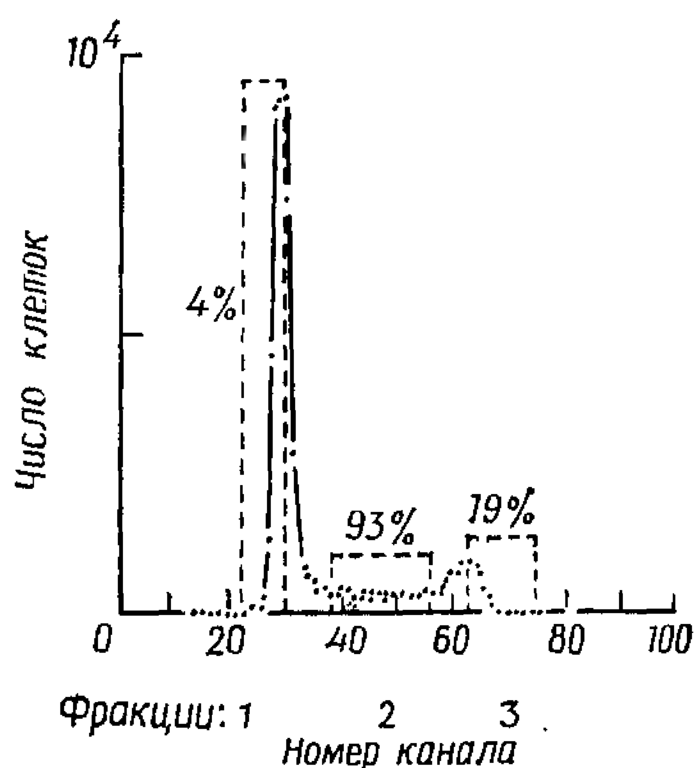


Рис. 10.13. Распределение клеток, разделяемых методом микрофлуориметрии в потоке. Клетки СНО импульсно метили ^{3}H-тимидином в течение 15 мин (1 мкКи/мл) и затем окрашивали бромидом этидия. Клетки переносили затем в проточный микрофлуориметр и сортировали на основе содержания в них ДНК. Клетки из указанных фракций (1, 2 и 3) анализировали затем с помощью радиоавтографии и показали, что содержание меченых клеток в этих фракциях составляет соответственно 4, 93, и 19%. [Перепечатано с любезного разрешения авторов (Kraemer et al., 1973) и издателей.]

$$dN/N_{(t)} = \left[\exp\left(\frac{1-\theta}{T}\right)\ln 2\right] d\theta \ln\frac{2}{T},$$

где dN/N_t представляет собой фракцию клеточной популяции, занимающую интервал $d\theta$ клеточного цикла в момент времени t.

Пользуясь этим уравнением, графически представленным на рис. 10.5, можно вычислить продолжительность фаз G1 (8,4 ч), G2+M (3,5 ч) и S (4,1 ч). Как показывает радиоавтографический анализ, во фронтальной части пика клеток в фазе G1 (рис. 10.13) лишь 4% клеток оказываются мечеными. В нисходящей части пика клеток в фазах G2+M мечеными оказываются 19% клеток, а в промежутке между этими пиками мечеными оказываются 93% клеток.

О высокой чувствительности метода свидетельствует тот факт, что с его помощью выявляется минорная фракция кле-

ток, представляющая менее 1% клеток популяции, содержание ДНК в которых вдвое превышает таковое в клетках в фазах G2+M.

Разработана программа для ЭВМ, позволяющая с высокой точностью оценить субпопуляции клеток в фазах G1, S и G2+M по результатам проточной микрофлуориметрии (Dean, Jeff, 1974). Сортирование клеток производится со скоростью 50 000 клеток в 1 мин, так что для разделения 10^6 клеток требуется 20 мин. Следовательно, эта очень дорогая установка может быть использована только для последующего биохимического анализа, использующего высокочувствительные методы.

10.8. Яды, облучение и клеточный цикл

10.8.1. Фаза S

Синтез РНК необходим для вступления клеток в фазу S, но не для самого синтеза ДНК, хотя фаза S не завершается в присутствии актиномицина (специфического ингибитора синтеза РНК). Добавление актиномицина D через 2 ч после начала фазы S не препятствует ее завершению, но при этом клетки далее не проходят через фазу G2 и не делятся (Mueller, Kajiwara, 1966). Авторы предполагают, что синтез РНК в конце фазы S необходим для репликации последних 3% ДНК.

Подавление синтеза белка оказывает немедленное действие на синтез ДНК (Stimac et al., 1977). Скорость движения репликационной вилки снижается в течение 15 мин после подавления синтеза белка, причем степень подавления синтеза белка коррелирует со степенью подавления включения ^{3}H-тимидина в ДНК в течение 60 мин. В дальнейшем угнетение синтеза ДНК усиливается вследствие снижения частоты инициации новых репликонов. Синтез ДНК не столь чувствителен к ингибиторам белкового синтеза, как сам синтез белка, вследствие чего хроматин, образованный в присутствии ингибиторов белкового синтеза, оказывается обедненным белками (White, Eason, 1973) и более чувствительным к действию нуклеаз (Weintraub, 1976).

Ингибиторы синтеза ДНК несомненно блокируют прохождение клетками фазы S. К числу таких ингибиторов относятся аналоги фолиевой кислоты (аминоптерин и аметоптерин; разд. 11.8.1 и 13.2.1), фтордезоксиуридин (разд. 11.8.2) и ингибиторы рибонуклеотидредуктазы (гидроксимочевина и высокие концентрации тимидина; см. разд. 11.8.3 и 11.8.4).

10.8.2. Фаза G2

Логарифм общего числа клеток является линейной функцией времени для культур в экспоненциальной фазе роста. Следовательно, если в нулевое время в культуру добавить ингибитор,

останавливающий продвижение клеток по циклу во время t перед клеточными делениями, то делиться будут только те клетки, которые от клеточного деления отделяет время, меньшее чем t. Логарифм числа клеток будет линейно расти в течение времени t, после чего кривая сделает изгиб, обозначая тем самым точку действия ингибитора в клеточном цикле (Tobey et al., 1971).

Эксперименты с использованием актиномицина D выявили необходимость в синтезе РНК за 30 мин до митоза (Kishimoto, Lieberman, 1964; Arrighi, Hsu, 1965). Использование пуромицина показало необходимость синтеза белка в течение фазы G2 для последующего деления клеток (Kishimoto, Lieberman, 1964). Более точные эксперименты, проведенные на клетках CHO, выявили потребность в синтезе РНК для митоза за 1,8 ч до деления и прекращение зависимости митоза от синтеза белка за 0,6 ч до митоза (Tobey et al., 1966).

Аналогичным образом была выявлена точка в клеточном цикле, когда клетки оказываются чувствительными к низким дозам рентгеновского облучения. Доза облучения в 9 рад не оказывает токсического действия, но временно снижает скорость

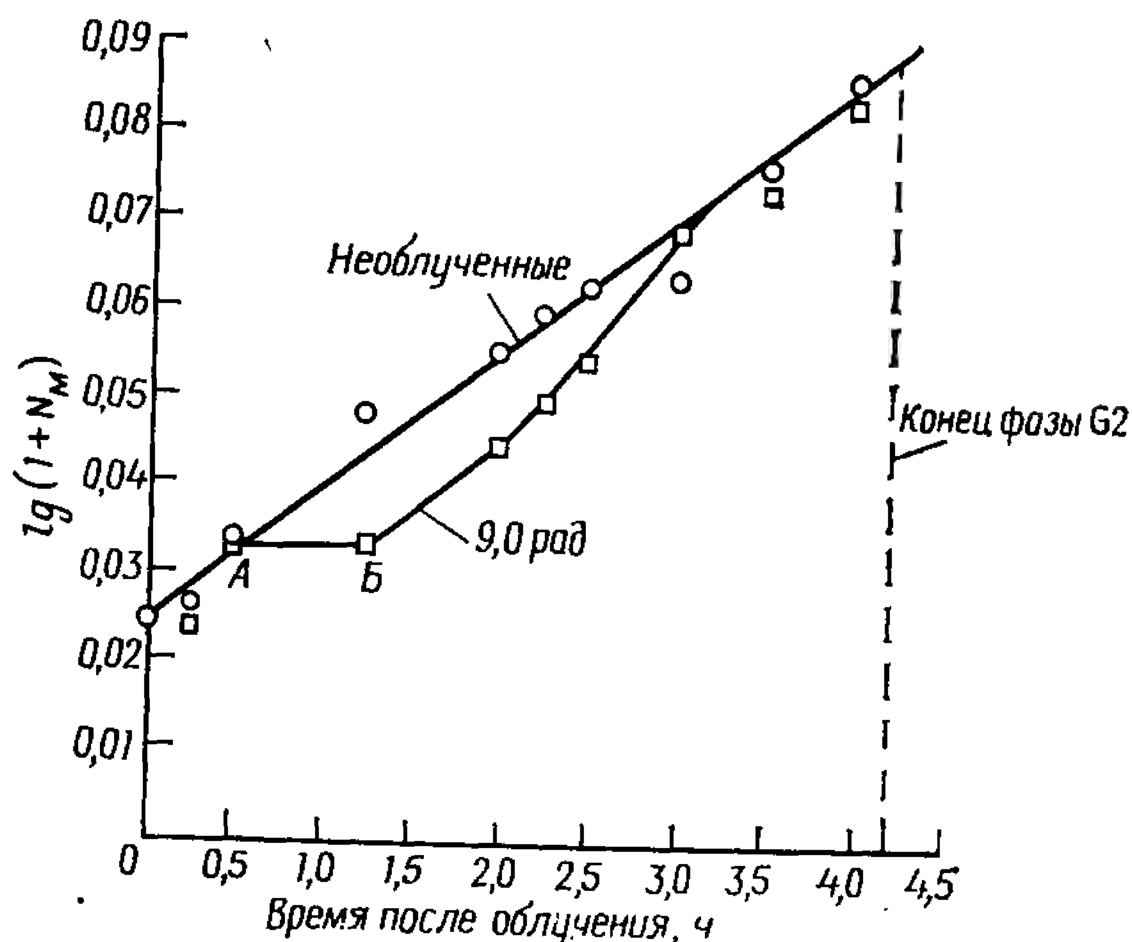


Рис. 10.14. Влияние низких доз рентгеновского облучения на накопление митотических клеток. Эксперимент проводился так же, как описано для клеток HeLa на рис. 10.9, но через 3 ч после добавления колцемида половину культур облучали рентгеном (9 рад) (нулевое время на графике). Через 0,6 ч перед профазой (А) продвижение клеток к митозу полностью подавляется, но спустя еще 0,7 ч (Б) митотические клетки начинают накапливаться с нормальной скоростью. Следовательно, облучение влияет только на небольшую часть клеток, находящихся в положении 0,6—1,3 ч перед профазой. Через 1,95 ч в этих клетках восстанавливается способность к митозу. O контрольные необлученные клетки; □ облученные клетки. (Puck, Steffen, 1963.)

прохождения клетками фазы G2 (рис. 10.14). Чувствительный к облучению этап расположен за 0,7—1,4 ч до митоза. Рентгеновское облучение клеток в этот интервал времени полностью блокирует клеточное деление. Однако через 1,35 ч клетки «излечиваются» и, подобно необлученным клеткам, проходят клеточный цикл, так что между 2,05 и 3 ч после облучения накопление митозов в облученной культуре происходит с большей скоростью, чем в контрольной необлученной культуре.

10.8.3. Фаза G1

Для прохождения клетками фазы G1 необходим синтез РНК и белка. Кроме того, как указывалось выше (разд. 10.6; см. также разд. 2.3 и гл. 15), различные ситуации, включая субоптимальные условия роста и стимуляцию дифференцировки (например, добавление диметилсульфоксида к клеткам эритролейкоза Френд), могут приводить к остановке клеток в фазе G1.

Используя мутантные линии клеток, удалось показать необходимость активности РНК-полимеразы II в середине фазы G1 для последующего вхождения клеток в фазу S (Rossini, Baserga, 1978).

10.9. Тимидинкиназа и моделирование клеточного цикла на ЭВМ

Изучение клеточного цикла затрудняется тем, что слишком много переменных могут оказать влияние на предсказание судьбы клетки. Многочисленные данные свидетельствуют об изменении активности ряда ферментов в течение клеточного цикла. Нетрудно представить, что эти изменения имеют существенное значение для контроля клеточного цикла на самых различных уровнях. Наиболее изученным из ферментов этого класса является тимидинкиназа (Adams, 1969a; Stubblefield, Mueller, 1965; Littlefield, 1966a, b; Bello, 1974), но периодические изменения отмечены также для дезоксицитидинкиназы (Brent, 1971), тимидилаткиназы (Brent et al., 1965), дезоксицитидилатдезаминазы (Gelbard et al., 1969), рибонуклеотидредуктазы (Turner et al., 1968; Murphree et al., 1969) и ДНК-полимеразы α (Lindsay et al., 1970; Furlong et al., 1973).

В каждом случае активность фермента увеличивается в течение фазы S и снижается в конце фазы G2 или самом начале фазы G1. Было показано (Bello, 1974), что стабильность тимидинкиназы слабо изменяется в течение клеточного цикла и инициация синтеза фермента происходит одновременно, но независимо от инициации синтеза ДНК. Окончание синтеза фермента требует завершения фазы S и оказывается зависимым от синтеза РНК в течение фазы G2.

В Хьюстонском университете Донаги (Donaghey) разработал для ЭВМ «Cell Sim» программу, с помощью которой было проверено предположение о том, что мРНК для тимидинкиназы синтезируется с постоянной скоростью только в течение фаз S и G2 и немедленно транслируется в активный фермент (Stubblefield, Dennis, 1976). Эта модель нашла количественное подтверждение в культуре фибробластов китайского хомячка с известными параметрами клеточного цикла при условии, что каждая клетка синтезирует в минуту одну молекулу мРНК в течение фаз S и G2 и каждая мРНК в течение трех минут транслируется в молекулу фермента. Время полужизни мРНК и фермента в этой системе составляет соответственно 9 и 150 мин. Предложенная модель не в состоянии объяснить быстрое падение активности тимидинкиназы в начале фазы G1, в связи с чем дополнительно постулируется снижение стабильности фермента в этот период клеточного цикла. Этот постулат, соответствующий данным о снижении времени полужизни тимидинкиназы с 6,2 до 4,4 ч между ранней фазой S и ранней фазой G1 в клетках KB (Bello, 1974), не учитывается в исходной компьютерной программе, но заложен в программу «Cell Sim II».

Глава 11

Синхронизация клеток

11.1 Введение

При необходимости получить популяцию клеток, находящихся в одной и той же фазе клеточного цикла, используются два различных принципа.

а. Можно блокировать клетки таким образом, чтобы они накапливались на специфической стадии цикла. Блокировка может быть химической или физиологической, но оба метода имеют тот недостаток, что клетки подвергаются неблагоприятному воздействию и в результате становятся по некоторым параметрам аномальными (см., однако, разд. 11.7).

б. Можно отобрать клетки, находящиеся на определенной стадии клеточного цикла. Отбор может происходить на основании тех или иных физических свойств, например слабого прикрепления митотических клеток к субстрату или различного содержания ДНК в клетках, находящихся на разных стадиях клеточного цикла. С другой стороны, отбор можно производить на основе химических свойств, вызывая избирательную гибель остающихся клеток.

Выбор метода зависит от цели эксперимента. В ряде случаев бывает целесообразно проводить начальную стадию эксперимента (например, мечение изотопами) на несинхронизированной, экспоненциально растущей культуре и затем отбирать для ферментативного анализа клетки на определенной фазе клеточного цикла, используя, например, зональное центрифугирование. В экспериментах такого рода отобранные клетки, как правило, далее не культивируются, так что их можно подвергать различным повреждающим воздействиям окружающей среды.

11.2. Отбор митотических клеток

Клетки, растущие в монослое, при делении принимают форму шара. Поэтому во время митоза они оказываются менее прочно прикрепленными к субстрату и могут быть легко отделены от него (Terasima, Tolmach, 1961, 1963; Robbins, Marcus, 1964; Peterson et al., 1968; Schall, 1973a).

При работе этим методом используются экспоненциально растущие клетки, и важно на протяжении всей процедуры селекции поддерживать постоянное значение pH и температуры.

Этот метод был использован применительно к клеткам CHO, растущим в среде Мак-Коя с 20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота в буфере Hepes (Klevecz et al., 1974, 1975). Клетки культивировали в этой среде при 37 °C и отбирали клетки, среди которых 98—99% находились в стадии митоза. Жизнеспособность отобранных клеток достигала 100%, и при пересеве половина клеток прикреплялась к подложке в течение 1 ч, а максимальное прикрепление достигалось в течение четырех часов (Klevecz, 1975). В этих опытах, однако, отбиралась очень малая часть исходных клеток. Сила прикрепления различных типов клеток к субстрату оказывается различной, так что для различных типов клеток следует, возможно, использовать модификации приводимых здесь методик отбора.

11.2.1. Встряхивание

— Высеять клетки в бутыли за 24 ч до первичного отбора. При работе с линией фибробластов китайского хомячка Don-C можно высевать $5 \cdot 10^7$ клеток во вращающиеся бутыли в среде Мак-Коя (см. разд. 11.2.2).
— Через 24 ч встряхнуть бутыль с клетками (исходно должно быть не менее 10^7 клеток) и удалить среду, содержащую мертвые клетки и их обломки. Встряхивание лучше всего производить в водяной бане на качалке так, чтобы бутыль встряхивалась 20 раз в течение 3 с; весь клеточный монослой должен при этом быть покрыт средой. Сила прикрепления к субстрату у различных линий клеток варьирует в широких пределах, и, следовательно, для каждого случая требуется экспериментально подбирать интенсивность встряхивания.
— Добавить свежую прогретую среду (избегать пипетирования среды на клеточный монослой) и инкубировать в течение 15, 30, 45 мин и т. д. Интервалы между сборами клеток для разных линий клеток различны.
— Собирать слабо прикрепленные клетки путем встряхивания, как указывалось выше, но в этот раз собирать среду в сосуды в ледяной бане, объединяя все сборы.
— Осадить клетки при 700g в течение 3 мин.
— Высеять митотические клетки ($\sim 10^5$ клеток на чашку диаметром 5 см). Клетки прикрепляются в подложке и делятся в течение часа.

Хотя выход митотических клеток низок (1—3%), он может быть увеличен удлинением срока сбора клеток до 2—3 ч.

Другой путь увеличения выхода митотических клеток — это накопление клеток в метафазе после кратковременной обработки колцемидом. При пересеве линии фибробластов китайского хомячка Don-C каждые 24 ч (Stubblefield et al., 1967) была получена частичная синхронизация клеток с пиками митозов че-

рез 7 и 19 ч после посева. При добавлении колцемида через 18 ч после посева и отбора митотических клеток через 22 ч выход клеток составляет 21% популяции, причем 86% этих клеток оказываются в метафазе. Эти клетки нормально растут и не отличаются от контрольных клеток по продолжительности митоза и времени генерации, кинетике синтеза ДНК и величине пролиферативного пула. Этот метод, однако, не является универсальным, поскольку обратимость действия колцемида реализуется не во всех клеточных культурах.

11.2.2. Трипсинизация

Было показано (Stublefield et al., 1967), что при использовании разбавленного трипсина чистота получаемых митотических клеток оказывается выше, чем при встряхивании. Отбор митотических клеток с помощью разбавленного трипсина производят следующим образом:

— Пересеивать клетки Don-C каждые 24 ч в среде Мак-Коя 5а (приложение 1), содержащей 20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и 0,08% гидролизата альбумина. Плотность посева клеток $1{,}2\cdot10^5$ клеток в 1 мл ($3\cdot10^4$ клеток на 1 $см^2$).

— Через 18 ч после посева добавить колцемид (0,06 мкг/мл) и продолжить инкубацию в течение 4 ч. Некоторые митотические клетки открепляются от субстрата в ходе инкубации и должны быть объединены с клетками, открепляющимися при трипсинизации.

— Удалить среду и заменить ее 0,1%-ным холодным трипсином в ФСБ.

— Слегка встряхнуть культуральный сосуд (2 цикла в секунду) либо вручную, либо на качалке в водяной бане.

— Через 45 с перенести суспензию митотических клеток в центрифужные пробирки, осадить клетки при 400g в течение 2 мин и ресуспендировать в свежей среде до концентрации $4\cdot10^4$ клетка/мл.

— Через 20—30 мин посеянные клетки синхронно делятся. Этот метод не является универсальным для всех клеточных линий, поскольку действие колцемида не во всех случаях оказывается обратимым.

11.3. Избирательная гибель клеток в одной из фаз клеточного цикла

Этот метод обычно основан на использовании либо тритированного тимидина с высокой удельной радиоактивностью (Whitmore, Culyas, 1966) (данный вариант применим для широкого круга клеток), либо гидроксимочевины (Sinclair, 1965) (данный

вариант применим только к некоторым, чувствительным, линиям клеток).

В основе метода лежит гибель клеток в определенной фазе клеточного цикла, что приводит к избирательному отбору клеток, находящихся вне фазы-мишени. При экспоненциальном росте клеток и прохождении клеток по клеточному циклу увеличение периода экспозиции приводит к снижению количества выживающих клеток и ширины диапазона клеточного цикла, в котором оказываются выживающие клетки. Однако такой вариант возможен только в теории, а на практике при инкубации в условиях, приводящих к 90%-ной гибели клеток, выжившие клетки вместо того, чтобы концентрироваться на границе фазы S, замедляют свой рост, и требуется несколько часов для их последующего вхождения в фазу S, так что при вхождении в фазу G2 синхронизация популяции клеток теряется.

Главный недостаток этих методов заключается в том, что погибшие клетки, хотя и теряют способность к делению, но в течение значительного времени сохраняют способность к метаболизму, что затрудняет проведение биохимических исследований.

Митотические клетки могут быть избирательно удаляемы в течение длительного периода времени. В результате популяция остающихся клеток оказывается обогащенной клетками в фазе G2 (Stublefield, 1964; Creasey, Markiw, 1965; Pfeiffer, Tolmach, 1967). К сожалению, помимо опасности отбора популяции медленно растущих клеток, использование подавляющих митоз колхицина, колцемида и винбластина приводит и к другим эффектам, например к подавлению синтеза клеточной РНК.

11.4. Отбор клеток по размеру

11.4.1. Отбор клеток в электронном счетчике

Более подробно основы этого метода рассматриваются в разд. 10.7.5. Для разделения клеток используется модифицированный электронный счетчик, т. е. счетчик Коултера, сопряженный с анализатором амплитуды импульсов и электронным клеточным сортировщиком. Эта система способна разделять клетки на различное число классов со скоростью 50 000 клеток в минуту. Клетки сохраняют жизнеспособноость, и время их генерации при разделении не меняется (Fulwyler, 1965; Van Dilla et al., 1967). Однако из-за высокой стоимости установки и относительно низкой скорости разделения этот метод к настоящему времени не получил широкого распространения в биохимии. Альтернативный метод использования электронного счетчика клеток для их разделения по размеру основан на измерении рассеянного света лазерного луча (разд. 10.7.5).

11.4.2. Зональное центрифугирование

Скорость оседания клеток зависит от их плотности и размера. Следовательно, относительно легко разделить клетки различного типа, различающиеся по плотности, но значительно труднее разделить клетки одного типа, находящиеся на различных фазах клеточного цикла, поскольку в этом случае скорость их седиментации (мм/ч) будет приблизительно пропорциональна $r^2/4$, где r — радиус клетки в микрометрах. На разных стадиях клеточного цикла объем клеток различается не более чем в два раза, а следовательно, различия в радиусе клеток не могут превышать 1,6.

Стабилизация седиментирующих клеток достигается с помощью градиента, и для создания такого градиента используются обычно сыворотка или фиколл (Pharmacia Ltd.) (Boone et al., 1968; Miller, Phillips, 1969; Macdonald, Miller, 1970; Warmsley, Pasternak, 1970). Для создания градиента используется также сахароза (Sinclair, Bishop, 1965; Morris et al., 1967; Shall, McCleland, 1971; Shall, 1973b), но в этом случае может пострадать жизнеспособность клеток, если не приняты специальные меры предосторожности для поддержания изотоничности раствора.

При центрифугировании клеток (Boone et al., 1968) через прерывистый (10—20%) градиент фиколла в МСИ, модифицированной для этой цели (удалены кальций и бикарбонат и концентрация фосфата увеличена в 10 раз), в зональном центрифужном роторе A=IX в течение 1 ч при 1000 об/мин при 20 °С удается получить четкое разделение различных типов клеток (клетки HeLa и тимоциты кролика).

Использование центрифуги для увеличения скорости седиментации клеток мы находим и в других работах (Sinclair, Bishop, 1965; Morris et al., 1967). Однако Шэлл (Shall, 1973b), а также Миллер и Филлипс (Miller, Phillips, 1969) использовали седиментацию в поле силы тяжести; в обеих работах описаны простые установки для создания градиента и разделения клеток. Установка Шэлла позволяет одновременно разделять 10^9 клеток, а в установке Миллера и Филлипса можно одновременно разделять $3 \cdot 10^8$ клеток. Аппараты Шэлла и Миллера и Филлипса весьма сходны; на рис. 11.1 представлена схема такой установки. В случае изготовления из стекла такую установку можно стерилизовать автоклавированием (при этом открытые концы трубок и резервуаров следует закрывать алюминиевой фольгой), и разделяемые на установке клетки могут быть использованы для дальнейшего выращивания в культурах.

Градиент создается из двух растворов. Резервуар A_1 содержит либо 10%-ную (вес/объем) сахарозу в полной среде, в которой концентрация NaCl снижена до 146 мМ для поддержания

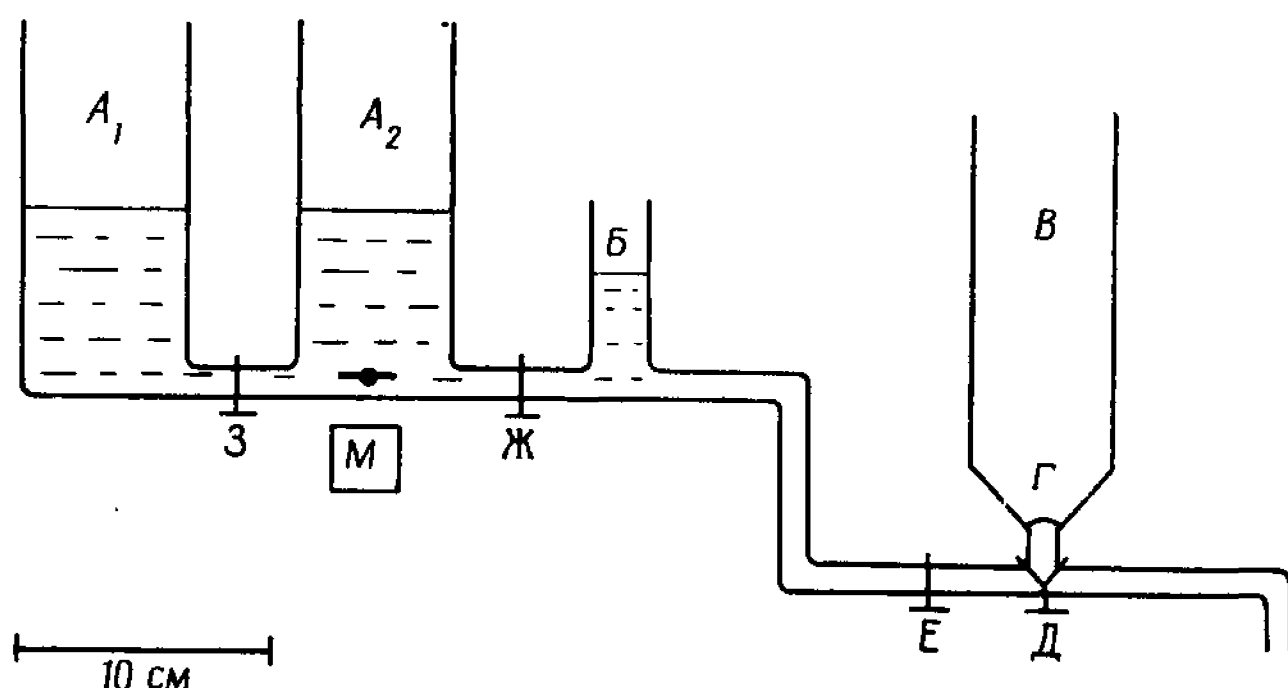


Рис. 11.1. Аппарат для отбора клеток путем осаждения в поле земного тяготения (описание см. в тексте). М — магнитная мешалка.

постоянного осмотического давления, либо 30%-ную сыворотку эмбриона крупного рогатого скота в ФСБ. Резервуар A_2 содержит соответственно либо 2,72%-ную (вес/объем) сахарозу в полной среде с концентрацией NaCl, сниженной до 40 мМ, либо 15%-ную сыворотку в ФСБ. Объемы, а следовательно, и высоты столбов жидкостей в каждом резервуаре должны быть одинаковыми (обычно по 250 мл на резервуар).

— При закрытом кране Ж открыть кран З и включить магнитную мешалку М, вращающую магнит в резервуаре A_2. Магнит должен вращаться быстро, чтобы обеспечить эффективное перемешивание компонентов.

— Внести в Б 10—30 мл а) не содержащей сыворотки среды или б) ФСБ и дать стечь жидкости в резервуар В для удаления пузырьков воздуха.

— Внести в Б суспензию клеток (10—20 мл) в ростовой среде с 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и дать суспензии стечь в резервуар В, где она образует тонкий слой под присутствующими там средой или ФСБ.

— Не впуская в систему воздух, позволить градиенту вытекать из А в резервуар В. Дефлектор Г предотвращает впрыскивание раствора в В, которое могло бы привести к перемешиванию слоя клеточной суспензии. Около 500 мл градиента должны быть введены в резервуар В со скоростью 30—40 мл/мин. Скорость тока жидкости контролируется краном Е (Quickfit and Quart Ltd.). Резервуар В должен содержать около 100 мл жидкости на каждый сантиметр высоты.

— Отстаивать 2—4 ч. Чем ниже температура, тем больше вязкость, следовательно, медленнее седиментация клеток. Однако если время седиментации достаточно продолжительно по сравнению с временем генерации, то лучше разделять

клетки при 4 °С. Если на градиенте наслоено слишком большое количество клеток, то возможно их «проваливание».

— Используя трехходовой кран Д, дать разделенным клеткам вытекать из резервуара В. Отбросить среду, содержащуюся в конической части В, и далее собирать фракции по 15 мл.

Известна более простая модификация аппарата (Macdonald, Miller, 1970), а также миниатюрный вариант (Shall, 1973b), в котором градиент (15 мл) формируется в трубке размерами 15×1,6 см, а клеточная суспензия ($3\cdot10^7$ клеток) наслаивается на него с помощью пипетки с широким кончиком. После отстаивания при 37 °С в течение 50 мин отбирается 1 мл жидкости с верхней части, в котором содержатся самые мелкие молодые клетки; после отмывания сахарозы клетки возвращаются в нормальную ростовую среду.

Этот метод позволяет в течение короткого периода времени отбирать большое количество клеток при удовлетворительном сохранении их жизнеспособности. Однако степень синхронизации выделенных клеток ниже, чем при отборе митотических клеток.

11.5. Синхронизация пересевом

Часто бывает трудно избежать некоторой синхронизации культивируемых клеток просто в результате рутинных манипуляций с клетками. Так, при пересеве клеток Don-C каждые 24 ч создается давление отбора, благоприятствующее клеткам с 12-часовым временем генерации и наиболее высокой частотой митозов через 7 и 19 ч после посева (Stubblefield, 1967).

Чаще всего пересев клеток проводят после выхода клеток из логарифмической стадии роста и перехода их в стационарную стадию (разд. 5.2). Это сопровождается частичной синхронизацией последующих циклов синтеза ДНК и клеточных делений.

— Установить культуру мышиных клеток L929 в среде Игла (модификация Глазго) с 10% сыворотки теленка и менять среду каждые два дня (рис. 5.2).

— Через 10 дней культивирования пересеять клетки с плотностью посева $2\cdot10^5$ клеток в 1 мл. Клетки можно высевать на покровные стекла для последующего радиоавтографического анализа или во флаконы Ру для биохимических исследований.

— Инкубировать культуры на покровных клетках с тритированным тимидином (5 мкКи/мл; 5 Ки/ммоль) в течение 30-минутных интервалов через различное время после посева. Для этого к 0,5 мл среды добавлять 10 мкл раствора, содержащего 2,5 мкКи ^{3}H-тимидина в концентрации 50 мкМ.

— Подготовить клетки для радиоавтографического анализа и

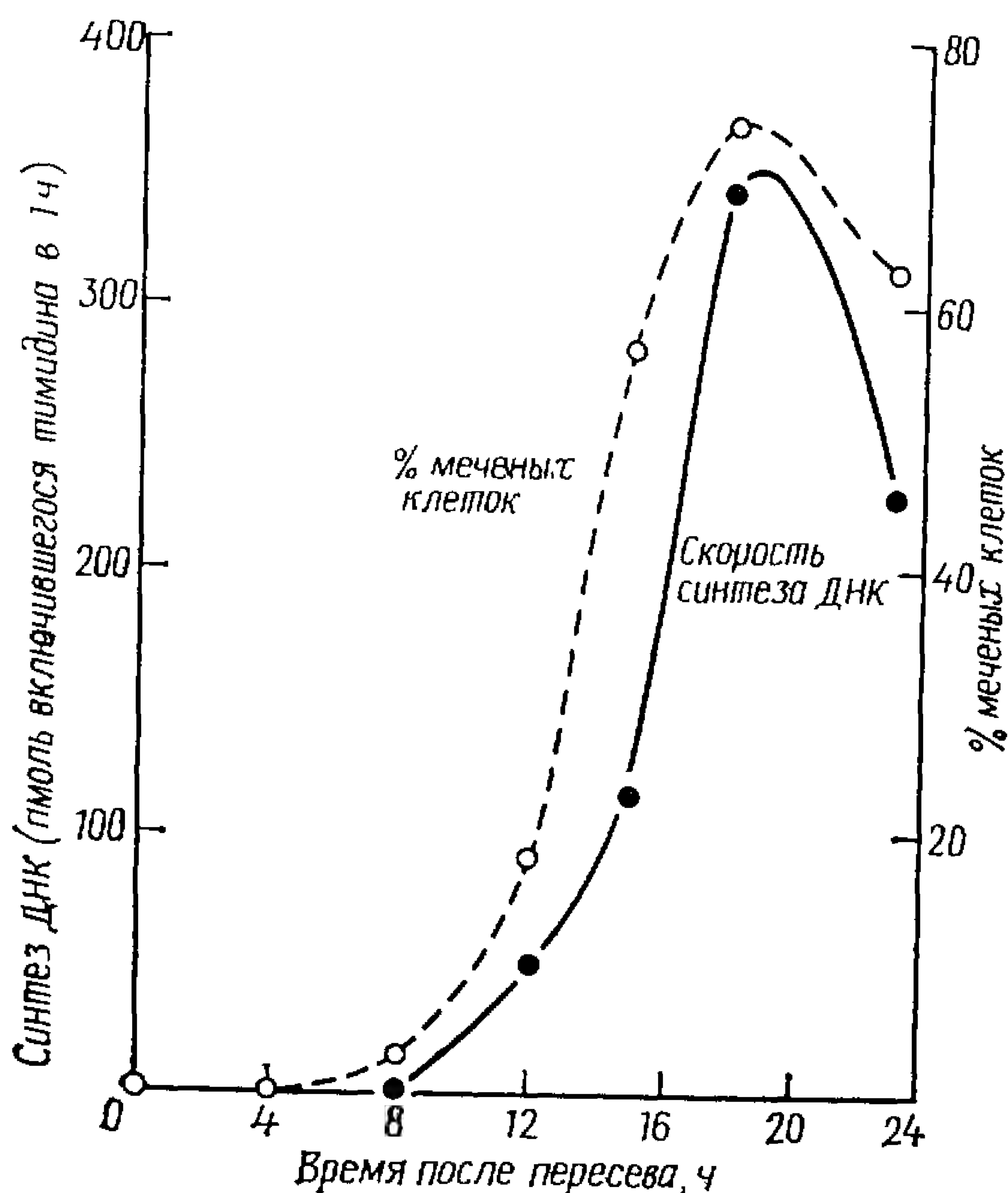


Рис. 11.2. Синтез ДНК в клетках, пересеянных из культуры в стационарной фазе. Мышиные клетки L929 пересевали в чашки диаметром 5 см ($4 \cdot 10^5$ клеток в 5 мл МСИ, содержащей 10% сыворотки теленка). В указанное время клетки инкубировали в течение 1 ч с ^{3}Н-тимидином и определяли его включение в ДНК.

подсчитать относительное количество меченых клеток и митотический индекс (разд. 12.3.1).

В этом эксперименте лишь немногие клетки входят в фазу S в течение 12 ч после посева (рис. 11.2), но к 18 ч около 70% клеток оказываются в фазе синтеза ДНК. Все клетки делятся немногим позднее 24 ч после посева. Это несколько превышает продолжительность нормального клеточного цикла, чему, возможно, два объяснения:

1. Пересев оказывает стимулирующее действие и после короткого лаг-периода клетки проходят всю фазу G1, прежде чем перейти фазу S и вступить в митоз.

2. В течение 12-часового периода происходит рост клеток, и лишь затем вероятность перехода этих клеток возрастает настолько, что они могут перейти из состояния А в фазу В и начать синтез ДНК (разд. 10.4).

Ограничение пространства — важный фактор, лимитирующий рост клеток в полном монослое. Однако ограничение питатель-

ных веществ также имеет важное значение (Dulbecco, Elkington, 1973) и лежит в основе следующих двух методов синхронизации.

11.6. Недостаточное содержание сыворотки

Клетки сирийских хомячков BHK21/C13 прекращают рост в среде с 0,25% сыворотки (Burk, 1970) и могут поддерживаться в покоящемся состоянии в течение 8 и более суток. При добавлении сыворотки синтез ДНК начинается через 9 ч, а пики митозов наблюдаются через 23 и 33 ч. Можно думать, что клетки задерживаются в фазе G1, и после стимуляции требуется 9-часовой лаг-период, прежде чем клетки войдут в стадию экспоненциального роста с временем генерации около 10—12 ч. Добавление сыворотки на 3 ч (сывороточный импульс) индуцирует прохождение одного клеточного цикла примерно у 50% клеток.

Аналогичные результаты были получены при культивировании куриных фибробластов (Temin, 1970) и мышиных фибробластов 3Т3 (Todaro et al., 1965).

Обнаружена почти линейная зависимость между продолжительностью действия сыворотки и относительным количеством стимулированных клеток (Brooks, 1976). Присутствие нуклеозидов усиливает ответ на сыворотку, в результате чего скорость вхождения клеток в фазу S резко увеличивается после лаг-периода. Характер этого изменения позволяет думать, что вхождение клеток в цикл представляет собой неупорядоченный процесс, происходящий с фиксированной вероятностью (Brooks, 1975) — аналогично тому, как было предложено Смитом и Мартином (Smith, Martin, 1973, 1974).

Для синхронизации клеток хомячка предлагается следующая процедура:

— Суспендировать клетки BHK21/C13 при концентрации 10^6 клеток в 10 мл среды Игла (модификация Глазго), содержащей 10% триптозофосфата, 0,05 мМ L-серин, 0,1 мМ L-оринитин, 0,1 мМ гипоксантин и 0,25% сыворотки теленка, и посеять клетки в чашки диаметром 5 см. У клеток BHK21/C13 в этих условиях отмечаются очень слабые синтез ДНК и деления, но при посеве в этих условиях трансформированных вирусом полиомы клеток PYY происходят два цикла клеточных делений при низкой концентрации сыворотки.

— Для инициации роста культуры добавить через 100 ч по 0,5 мл сыворотки теленка на чашку.

11.7. Голодание по изолейцину

Было показано, что вступившие в стационарную фазу клетки CHO в среде Хэма F10 могут быть стимулированы к дополнительному циклу клеточного деления путем смены среды. В этом случае ограничение роста обусловлено не факторами сыворотки, а недостатком изолейцина, концентрация которого в среде Хэма F10 составляет лишь 5—10% от его содержания в других средах (Ley, Tobey, 1970; Tobey, Ley, 1970).

Экспоненциально растущие клетки CHO, L929, BHK21/C13 могут быть перенесены в дефицитную по изолейцину среду, содержащую диализованную сыворотку; в этих условиях они задерживаются в фазе G1 (Tobey, Ley, 1971; Everhart, 1972; Tobey, 1973; Skoog et al., 1973). Скорость синтеза ДНК снижается в течение нескольких часов после того, как клетки помещают в среду с дефицитом изолейцина, и количество клеток за этот период увеличивается на 30% в результате деления клеток, находившихся в фазах S, G2 и митозе. Небольшие количества изолейцина в среде обеспечивают несколько большее увеличение числа клеток (Tobey, 1973). При этом не отмечается признаков несбалансированного роста и биосинтетическая способность клеток поддерживается на значительно более высоком уровне, чем у клеток в стационарной фазе роста культуры (Enger, Tobey, 1972).

Добавление изолейцина приводит к индукции синтеза ДНК у большинства клеток через 4—5 ч, и митотический индекс в культуре клеток CHO начинает увеличиваться через 12 ч.

— Собрать суспензию клеток CHO на стадии экспоненциального роста, промыть их лишенной изолейцина средой Игла.
— Посеять $7{,}5 \cdot 10^5$ клеток CHO в чашки диаметром 5 см в МСИ, лишенной изолейцина и содержащей 5% диализованной сыворотки эмбриона крупного рогатого скота.
— После инкубации в течение ночи заменить среду на свежую, содержащую изолейцин ($2 \cdot 10^{-6}$ M) и 10% недиализованной сыворотки эмбриона крупного рогатого скота.
— Если клетки посеяны на покровные стекла, то при радиоавтографическом анализе после импульсной клетки ^{3}H-тимидином (5 мкКи/мл) будет обнаружено появление клеток в фазе S через 4 ч после добавления изолейцина.

Механизм действия изолейцинового голодания неясен, однако это не просто отражение общего дефицита аминокислот, поскольку голодание по лейцину вызывает более выраженное подавление клеточного роста без какой-либо синхронизации культуры (Everhart, 1972; Tobey, 1973). Скорее, ответ клеток на изолейциновое голодание может указывать на некоторую неоднородность G1.

Результаты, полученные этим методом, сравнимы с результатами отбора митотических клеток в том смысле, что почти 100% клеток в полученной популяции оказываются на стадии G1. Данный метод проще, чем отбор митотических клеток, и может быть использован применительно к большему числу клеток.

11.8. Блокирование фазы S

Синхронизация клеток на границе фаз G1/S может быть достигнута нарушением синтеза одного или более дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, необходимых для синтеза ДНК, при условии, что это нарушение не препятствует протеканию других клеточных процессов, таких, как синтез РНК и белка.

Если блок поддерживается в течение 16 ч (т. е. в течение $T-tS$), то около 70% экспоненциально растущей культуры скапливаются в начале фазы S. На практике трудно определить, действительно ли клетки синтезируют ДНК, хотя и с пониженной скоростью, т. е. действительно ли клетки находятся в фазе S. Клетки, находящиеся в фазе S, к началу блока остаются в этой фазе до снятия блока, после чего 70% клеток, находящихся на границе фаз G1 и S, синхронно проходят фазы S и G2 и делятся. Эти синхронизированные клетки часто бывает удобно использовать для изучения событий, происходящих в фазах S и G2. Этот метод, однако, обладает следующими недостатками.

1. Только 70% клеток оказываются синхронизированными, а 30% клеток опережают основную группу клеток на 6 ч и менее.

2. В присутствии агентов, блокирующих синтез ДНК, могут происходить другие события, не являющиеся непосредственным результатом подавления синтеза ДНК.

3. Добавление агентов, блокирующих синтез ДНК, может не влиять на протекание процессов, не связанных непосредственно с синтезом ДНК, так что некоторые аспекты клеточного метаболизма могут отражать активность, присущую клеткам в фазе G2 и даже в G1, хотя события, связанные с синтезом ДНК, задерживаются в присутствии этих агентов на границе фаз G1 и S.

Такой несбалансированный рост, продолжительность которого превышает время генерации, приводит к гибели клеток (Ruekert, Mueller, 1960). Несбалансированный рост характерен для любых клеток, подготовившихся к делению (разд. 10.4), но блокированных по какой-либо функции, — в том числе для клеток, инкубированных с колцемидом в течение более чем нескольких часов. Более того, эффекты, обусловленные избирательным подавлением синтеза ДНК, могут не проявляться

вплоть до освобождения синхронизированных клеток из блока и их вступления в следующую фазу G1 (Firket, Mahieu, 1966; Cress, Gerner, 1977). Было показано, что продолжительность фазы G2 не зависит от продолжительности аминоптеринового блока клеток вплоть до 8 ч инкубации с антиметаболитом.

Первый недостаток метода блокирования клеток в фазе S может быть устранен применением двойного блока. При этом методе агент, блокирующий синтез ДНК, добавляют к клеткам, которые уже обработаны или отобраны таким образом, что все они находятся в фазе G1. Это обеспечивает сбор всех клеток на границе фаз G1/S. Начальный отбор может быть произведен отбором митотических клеток (разд. 11.2) либо путем использования популяции клеток, непосредственно перед этим стимулированных к пролиферации добавлением сыворотки (разд. 11.6), лимитирующей аминокислоты (разд. 11.7), пересевом клеток (разд. 11.5), либо добавлением фитогемагглютинина (разд. 6.2.5). Термин «техника двойного блока», однако, применяется, как правило, к клеткам, у которых и первичный отбор, и установление блока осуществляются сходными методами. Так, для блокирования синтеза ДНК могут использоваться высокие концентрации тимидина (разд. 11.8.3). Если популяцию клеток обработать 3 мМ тимидином в течение 16 ч и затем убрать тимидин, то 70% клеток, находящихся на границе фаз G1/S, и 30% клеток, остановленных в фазе S, начнут движение по циклу, и спустя 8—10 ч все клетки окажутся в фазе G1. Если через 12 ч после снятия блока применить повторный тимидиновый блок, то все клетки подойдут к началу фазы S и на том остановятся.

На практике для синхронизации клеток на границе фаз G1/S используются как тимидин, так и другие агенты, такие, как аминоптерин, аметоптерин, 5-фтордезоксиуридин или гидроксимочевина.

11.8.1. Действие аминоптерина и аметоптерина (метотрексата)

Эти ингибиторы подавляют синтез ДНК вскоре после их добавления к клеткам. Включение ^{3}H-дезоксиуридина в ДНК снижается до 3% от контроля в течение 15 мин после добавления 10 мкМ аминоптерина; даже при концентрации 0,1 мкМ аминоптерин подавляет синтез ДНК до 20% от исходного в течение 45 мин после добавления (Siegers et al., 1975). Концентрации аметоптерина в диапазоне от 0,1 М до 1 мкМ блокируют синтез тимидилатов, но синтез ДНК продолжается с заметной скоростью, и тимидилатный пул истощается медленно (Adams et al., 1971; Baumunk, Freidman, 1971; Fridland, 1974; Fridland, Brent, 1975).

Аминоптерин и аметоптерин представляют собой 4-аминоана-

логи фолиевой кислоты (рис. 13.3) и, следовательно, являются эффективными ингибиторами дигидрофолятредуктазы (КФ 1.5.1.3) (Blakley, 1969). Этот фермент катализирует восстановление фолиевой кислоты и дигидрофолиевой кислоты до тетрагидрофолиевой кислоты, представляющей собой активный кофермент, участвующий во многих различных звеньях переноса одноуглеродных фрагментов. Как описано в гл. 13, тетрагидрофолят участвует в метаболизме а) аминокислот глицина и метионина, б) второго и восьмого углеродных атомов пуринового кольца, в) метильной группы тимидина, а также принимает непрямое участие в синтезе холина.

Чтобы сконцентрировать эффект добавляемых ядов на метаболизме тимидина, другие их эффекты предотвращаются добавлением в среду гипоксантина или аденозина (30 или 200 мкМ) и глицина (100 мкМ), не считая метионина и холина, уже присутствующих в среде. Пул тетрагидрофолиевой кислоты в клетках достаточно велик, и, помимо синтеза кофермента из витамина, единственным процессом, зависящим от активности дигидрофолятредуктазы, оказывается регенерация тетрагидрофолята и дигидрофолята в ходе синтеза dTMP, т.е. процесс, протекающий в течение фазы S. Следовательно, истощение пула тетрагидрофолиевой кислоты и накопление дигидрофолиевой кислоты под действием этих ядов происходит только в клетках, находящихся в фазе S. Оказалось, однако, что при выращивании клеток китайского хомячка в среде с 0,25 мкМ аметоптерином в течение 24 ч не происходит накопления в клетках дигидрофолиевой кислоты (McBurney, Whitmore, 1975), и концентрации аметоптерина вплоть до 2,5 мкМ не влияют на синтез глицина, если только клетки не инкубировались в течение предшествующих 48 ч в отсутствие фолиевой кислоты (McBurney, Whitmore, 1975), что приводило к истощению пула тетрагидрофолиевой кислоты. Это позволило авторам предположить, что аминоптерин может оказывать более прямое действие на синтез тимидилатов и пуринов, тем более, что ранее было обнаружено его действие на активность тимидилатсинтетазы (Borsa, Whitmore, 1969). Восстановление фолиевой кислоты оказалось более чувствительным к действию аметоптерина по сравнению с активностью тимидилатсинтетазы (McBurney, Whitmore, 1975), и через 48 ч инкубации клеток с низкими дозами аметоптерина рост клеток ограничивался вследствие инактивации фолятредуктазы. Используя низкие дозы аметоптерина, удалось получить линии мутантных клеток и с их помощью примирить эти две группы данных.

Ингибирующее действие антифолятов может быть снято либо сменой среды (Adams, 1969a, b), либо, что чаще используется, добавлением в среду тимидина, обеспечивающего синтез dTTP под действием ферментов тимидин- и тимидилаткиназы.

11.8.2. Действие 5-фтордезоксиуридина

5-фтордезоксиуридин представляет собой аналог тимидина и может входить в клетки и фосфорилироваться так же, как и тимидин, с образованием 5-фтордезоксиуридинмонофосфата, который является конкурентным ингибитором тимидилатсинтетазы относительно dUMP. Поскольку, однако, он может конкурировать с тимидином за вхождение в клетки и фосфорилирование, не рекомендуется использовать его при количественных оценках синтеза ДНК. Его действие может быть прекращено таким же образом, как и действие антифолятов.

11.8.3. Действие высоких концентраций тимидина

Захваченный клетками тимидин быстро превращается в dTTP, и размер внутриклеточного пула последнего зависит от внеклеточной концентрации тимидина (см. рис. 12.5). Это приводит к заметному влиянию на скорость синтеза ДНК даже столь низкой внеклеточной концентрации тимидина, как $3 \cdot 10^{-7}$ (Cooper et al., 1966). При концентрации тимидина выше 1 мМ подавление синтеза ДНК становится почти что полным (Morris, Fisher, 1960; Xeros, 1962; Bootsma et al., 1964; Studzinski, Lambert, 1969). Имеются, однако, данные о том, что синтез ДНК проходит со скоростью около $^1/_3$ от нормальной даже в присутствии 2 мМ тимидина (Bostock et al., 1971), и, как показано на рис. 12.3, для полной остановки роста клеток требуется концентрация тимидина 5 мМ.

Подавление синтеза ДНК обусловлено действием dTTP, который является аллостерическим ингибитором рибонуклеотидредуктазы (Reichard et al., 1961; Moore, Hurlbert, 1966; Brown, Reichard, 1969; Kummer et al., 1978). Этот фермент ответствен за восстановление всех четырех рибонуклеозиддифосфатов (rNDP) до соответствующих дезоксирибонуклеозиддифосфатов (dNDP), он служит мишенью сложного аллостерического контроля, который наиболее полно изучен на примере бактериального фермента. Большинство исследований фермента млекопитающих показали его сходство с бактериальным ферментом, однако в последнее время появились указания на то (Peterson, Moore, 1976; Cory et al., 1976), что в клетках млекопитающих существуют два фермента, катализирующих восстановление различных субстратов.

dTTP требуется в качестве аллостерического активатора для восстановления GDP, а dGTP в свою очередь представляет собой аллостерический активатор восстановления ATP. Вместе с тем dTTP является аллостерическим ингибитором восстановления CDP и UDP, а dATP оказывается аллостерическим ингибитором восстановления всех четырех нуклеотиддифосфатов

(NDP). Предполагается, что эта сложная система контролирует сбалансированную поставку дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) для синтеза ДНК. Поскольку восстановление UDP и CDP лежит на пути биосинтеза dTTP, то контроль на этих этапах не представляется неожиданным (рис. 11.3), и синтез ДНК

Тимидин
dUTP dTMP → dTDP → dTTP →
UDP → dUDP dUMP
ДНК
CDP → dCDP → dCMP ← Дезоксицитидин
dCTP →

Рис. 11.3. Взаимопревращения дезоксирибонуклеотидов.

подавляется высокими концентрациями dTTP, снижающими образование dCTP. Помимо удаления ингибиторных концентраций тимидина из культуральной среды, блок синтеза ДНК может быть также снят добавлением дезоксицитидина в концентрации 10 мкМ (Morris, Ficher, 1960; Bjursell, Reichard, 1973).

11.8.4. Действие гидроксимочевины

Гидроксимочевина подавляет синтез ДНК также благодаря действию на рибонуклеотидредуктазу, но в этом случае снижается пул пуриновых рибонуклеотиддифосфатов, а пул dTTP слегка увеличивается (Turner et al., 1966; Adams, Lindsay, 1967; Krakoff et al., 1968; Adams et al., 1971; Skoog, Bjursell, 1974). Смена среды не приводит к полному обращению действия гидроксимочевины.

11.9. Индукции синхронизации на границе фаз G1/S

11.9.1. Голодание по изолейцину и гидроксимочевина

— Посеять $7{,}5 \cdot 10^5$ промытых клеток CHO в чашки диаметром 5 см в МСИ, лишенной изолейцина и содержащей 5% диализованной сыворотки эмбриона крупного рогатого скота.
— После 8 ч инкубации сменить среду на МСИ с изолейцином, 10% недиализованной сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и 2 мМ гидроксимочевиной.
— После 16 ч вновь сменить среду на полную среду без гидроксимочевины. Большинство клеток оказываются при этом на

границе фаз G1/S и немедленно начинают синтез ДНК. Это может быть прослежено радиоавтографически, по общему включению ^{3}H-тимидина, или позднее по появлению митотических клеток.

11.9.2. Клетки в стационарной фазе и аминоптерин

— Установить культуру мышиных клеток L929 в бутылях Ру в среде Игла (модификация Глазго) с 10% сыворотки теленка.
— Менять среду каждые два дня.
— На 8-й день снять клетки трипсинизацией и посеять по $4 \cdot 10^5$ клеток в чашки диаметром 5 см в той же среде, в которую добавлены аминоптерин (2 мкМ), аденозин (200 мкМ) и глицин (100 мкМ).
— Через 16 ч снять блок добавлением тимидина ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и дезоксицитидина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), после чего клетки начинают синтезировать ДНК, вначале медленно, но через 3 ч с максимальной скоростью.

11.9.3. Двойной тимидиновый блок

— Посеять по $3 \cdot 10^5$ клеток HeLa в чашки диаметром 5 см в среде Игла (модификация Глазго) с 10% сыворотки теленка и 3 мМ тимидином.
— После 16 ч сменить среду на свежую без тимидина.
— Через 8 ч добавить тимидин до конечной концентрации 3 мМ.
— После следующих 16 ч повторить вторую стадию, что приведет к синхронному вступлению клеток в фазу S.

11.9.4. Сравнение методов

Метод двойного тимидинового блока наиболее широко распространен в экспериментальных исследованиях, но он утомителен и имеет еще и тот недостаток, что вступление клеток в фазу S в течение первого часа или около того сопровождается снижением пула dTTP, что затрудняет оценку скорости синтеза ДНК.

Метод с изолейцином/гидроксимочевиной также включает в себя две смены среды, но первая из них может быть просто заменена добавлением изолейцина в неполную среду.

Метод с аминоптерином и клетками в стационарной фазе имеет тот недостаток, что для подготовки клеток требуется целая неделя, хотя последующие манипуляции очень просты.

Возможны, естественно, изменения и другие комбинации этих методов, например: отбор митотических клеток и тимидиновый блок, аминоптериновый блок, снимаемый низкими концентра-

циями тимидина, за которым следует тимидиновый блок, обращаемый дезоксицитидином.

Все эти методы обеспечивают накопление 80—90% клеток на границе фаз G1/S и весьма удобны для исследования популяций клеток, находящихся в фазе S. Они легко применимы для проведения крупномасштабных экспериментов, вплоть до уровня вращающихся бутылей, но при таком масштабе применение двойного тимидинового блока требует значительного расхода тимидина. Можно использовать концентрированные растворы тимидина, стерилизованные автоклавированием, но большинство других растворов должны быть стерилизованы фильтрованием.

11.10. Синхронизация в фазе G2

Фазу G2 клеточного цикла исследовать, по-видимому, труднее всего, поскольку наиболее трудно получить популяцию клеток, синхронизированных в фазе G2. Дело в том, что если клетки синхронизированы путем отбора митотических клеток или накоплением на границе фаз G1/S, то при достижении ими фазы G2 степень синхронизации заметно снижается. Это происходит в результате дисперсии скоростей, с которыми индивидуальные клетки проходят клеточный цикл. Популяции клеток в фазе G2 всегда содержат клетки, находящиеся в других фазах клеточного цикла, и максимальное обогащение клеток китайского хомячка CHO, находящихся в фазе G2, оказывается 0,7 в случае двойного тимидинового блока и 0,4 в случае отбора митотических клеток (Enger et al., 1968).

Популяции культивируемых клеток останавливаются в фазе G1, т. е. между клеточными делениями и началом синтеза ДНК. Есть указания, что часть эпидермальных клеток уха мыши задерживается в фазе G2 (Gelfant, 1959, 1963), хотя результаты более поздних исследований не подтвердили этого вывода (Sauerborn et al., 1978). Сообщалось, что эмбриональные фибробласты человека, поддерживаемые в культуре в течение 48 пассажей, т. е. на терминальной стадии, могут быть остановлены в фазе G2 (Maciero-Coelho et al., 1966), но такие клетки столь аномальны, что не могут быть использованы для изучения фазы G2.

Один из путей получения популяции клеток в фазе G2 — это получение мутантных линий с температурочувствительной стадией в фазе G2; метод отбора таких температурочувствительных мутантов известен (Basilico, 1978).

Глава 12

Использование радиоактивных изотопов в клеточной культуре

Клеточные культуры обладают многими преимуществами перед интактными животными, когда речь идет о включении радиоактивной метки и изучении действия лекарственных препаратов и гормонов. При использовании культур метка или лекарственный препарат могут быть добавлены и удалены в определенное время, их внеклеточная концентрация и удельная активность могут поддерживаться постоянными и, кроме того, на их метаболизм не будут влиять клетки других органов. Это не означает, конечно, что использование изотопов в культурах клеток лишено своих собственных подводных камней.

12.1. Определение скоростей синтеза ДНК

Определение скорости синтеза ДНК в популяции клеток или в индивидуальных клетках может потребоваться в качестве меры скорости роста клеток или при изучении клеточного цикла, или при непосредственном изучении метаболизма ДНК. Однако при добавлении тритированного тимидина к культивируемым клеткам возникает ряд проблем.

1. Для включения в ДНК тимидин должен пройти несколько последовательных этапов фосфорилирования:



Тимидин ⟶ dTMP ⟶ dТДР ⟶ dTTP ⟶ ДНК.

Для того чтобы включение тимидина отражало скорость синтеза ДНК, а не активность промежуточного фермента, лимитирующего скорость, клетки должны быть лишены барьера проницаемости, а различные киназы не должны быть скорость-лимитирующими компонентами этой цепи. Однако тимидилаткиназы отсутствуют в нерастущих клетках, а активность тимидинкиназы значительно изменяется в течение клеточного цикла (Stubblefield, Dennis, 1976). Следовательно, включение в клетки тимидина и его фосфорилирование могут быть скорость-лимитирующими этапами в клетках — за исключением фаз S и G2. Действительно было показано, что вне этих фаз скорость вхождения тимидина очень низка (Adams, 1969a). В фазе S киназы перестают быть скорость-лимитирующими звеньями, а анализ

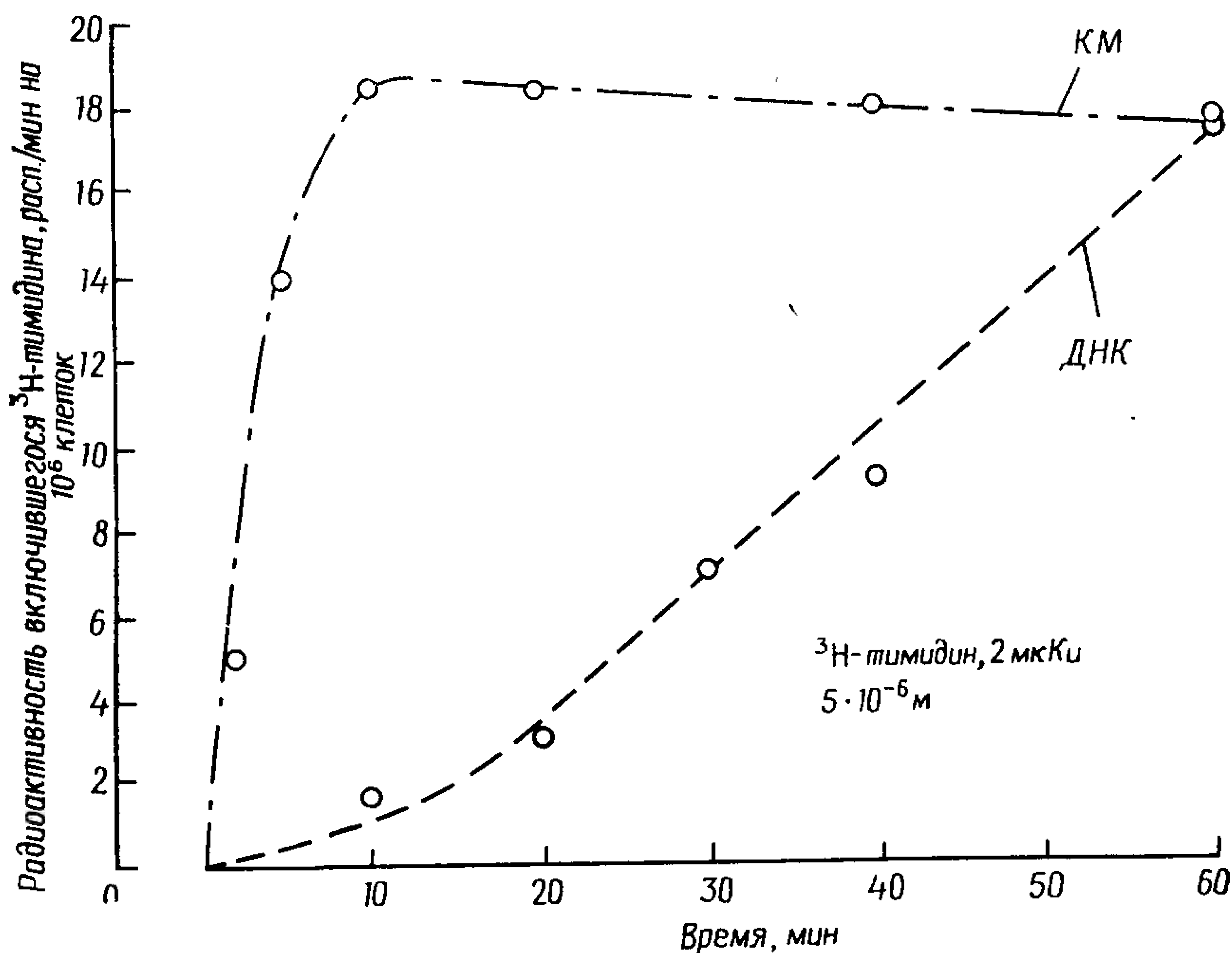


Рис. 12.1. Уравновешивание ^{3}H-тимидина с кислоторастворимым пулом и его включение в ДНК. Мышиные клетки L929, растущие в чашках диаметром 5 см, инкубировали с ^{3}H-тимидином (0,7 мкКи/мл; 5 мкМ) в течение указанного времени, после чего клетки быстро промывали три раза ледяным СБСР. Кислоторастворимый материал (КМ) экстрагировали холодной 5%-ной ТХУ и после промывки кислотой и этанолом клетки солюбилизировали в 0,3 н. NaOH и определяли включение в ДНК. [Перепечатано из (Adams, 1969a) с любезного разрешения издателей.]

кислоторастворимого пула клеток на этой фазе выявил преобладание в нем dTTP (Gentry et al., 1965; Adams, 1969a).

2. Изменения в концентрации добавленного в среду тимидина могут влиять на его поглощение клетками, его фосфорилирование и размер пула dTTP. В течение 10 мин после добавления тритированного тимидина в культуру клеток количество ^{3}H в кислоторастворимом пуле (внутриклеточные dTMP, dТДР и преимущественно dTTP) достигает равновесного уровня (рис. 12.1) (Gentry et al., 1965; Adams, 1969a). Очевидно, что существует равновесие между количеством образующегося ^{3}H-dTTP и используемого для синтеза ДНК, но величина пула радиоактивных дезокситимидилатов определяется концентрацией внеклеточного тимидина (рис. 12.2). Это может достигаться сочетанием прямого усиления тимидинкиназы ее субстратом и ингибирования фермента под действием dTTP по механизму обратной связи (Ives et al., 1963). Размер пула остается по-

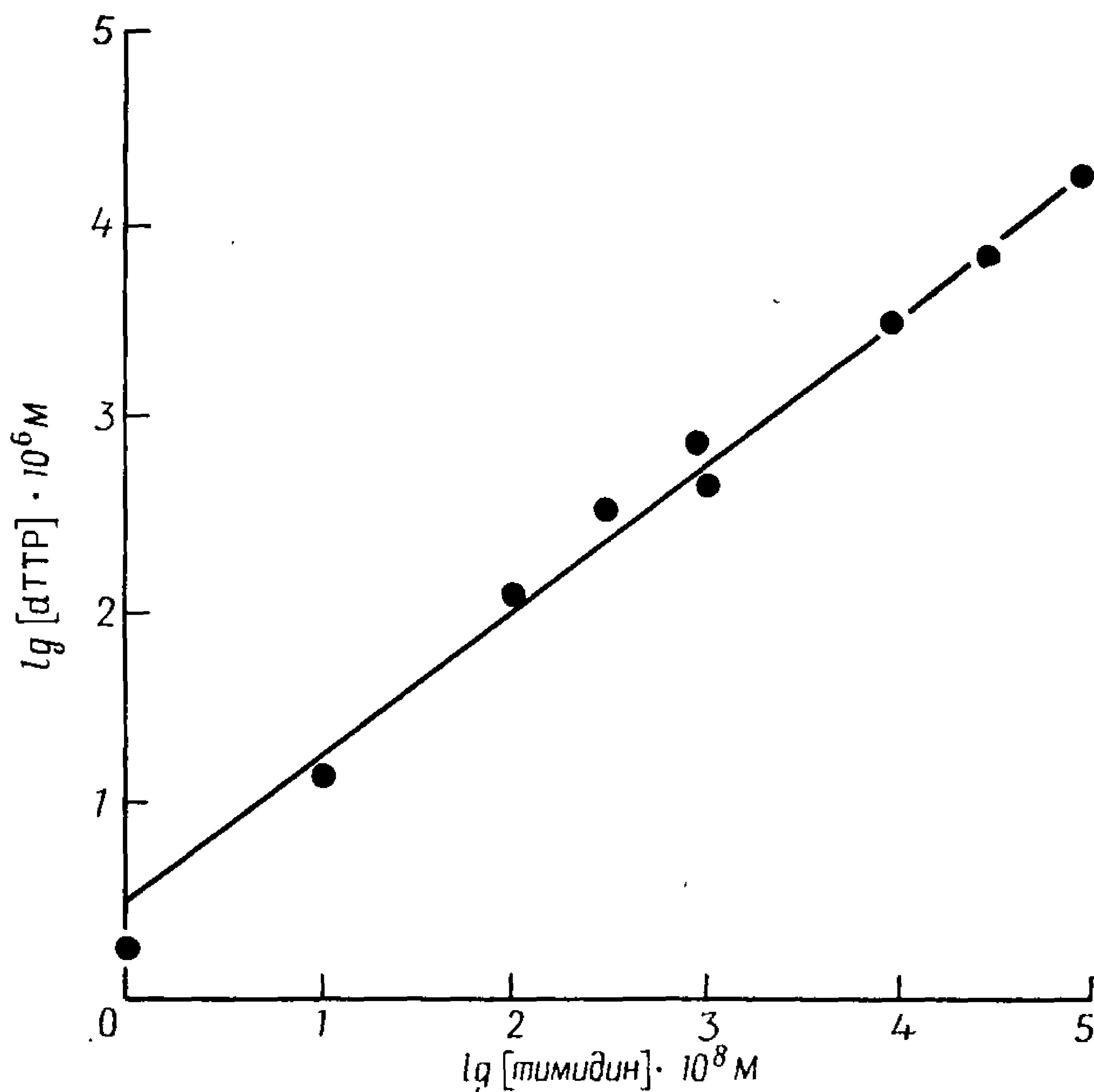


Рис. 12.2. Взаимосвязь между концентрацией внеклеточного тимидина и экзогенно полученным ядерным пулом dTTP. Мышиные клетки L929 инкубировали 30 мин с ^{3}H-тимидином в указанной концентрации и экстрагировали кислоторастворимый пул клеток (см. рис. 12.1). При определении концентрации dTTP исходили из того, что вся радиоактивность кислоторастворимого пула представлена ^{3}H-dTTP и что этот нуклеотид локализован в ядрах клеток, находящихся в фазе S. Объем ядра принимали равным 500 мкм^{3}. [Перепечатано из (Adams, 1969a) с любезного разрешения издателей.]

стоянным после достижения равновесия, пока не начнет снижаться внеклеточное содержание. Это происходит через несколько часов, если внеклеточная концентрация тимидина составляет 10^{-8} М, и даже при концентрации 10^{-5} М 10% тимидина может быть использовано в течение 24 ч. Так, если 10^6 клеток удваиваются каждые 24 ч, то им требуется примерно

$$10^6 \cdot 10/3 = 3{,}3 \cdot 10^6 \text{ пг тимидина} = 10^4 \text{ пмоль тимидина.}$$

Это означает, что если единственным источником тимидина является тимидин внеклеточной среды, то 5 мл среды с 10^{-6} М тимидином, содержащей $5 \cdot 10^3$ пмоль тимидина, достаточно для поддержания экспоненциального роста 10^6 клеток в течение менее чем 12 ч,

$$\text{или } t = Tcv/DN,$$

где t — время в часах до истощения тимидина, D — содержание



Рис. 12.3. Подавление роста клеток тимидином. Около 10^5 клеток в 5 мл МСИ, в которую добавлены витамины и сыворотка теленка, высевали в чашки диаметром 5 см и инкубировали в присутствии указанных концентраций тимидина. Через 4 суток монослой клеток трипсинизировали и подсчитывали число клеток в счетчике. ● L929; ○ HeLa ВНК; △ BSCl; × CHO.

ДНК (пг/клетка), N — число клеток в миллионах, v — объем среды в мл, c — концентрация тимидина в (нмоль/мл; мкМ) и T — время генерации в часах.

Размер пула неограниченно растет при увеличении внеклеточной концентрации тимидина вплоть до 10 мМ (рис. 12.2), что указывает на огромный избыток внутриклеточных киназ (Cleaver, Holford, 1965; Gentry et al., 1965; Copper et al., 1966; Adams, 1969a; Stimac et al., 1977).

3. dTTP синтезируется также эндогенно. Этот путь включает в себя рибонуклеотид-редуктазу. Фермент находится под аллостерическим контролем; одним из контролирующих элементов является dTTP, который в высоких концентрациях подавляет восстановление CDP и UDP, приводя тем самым к снижению размера пула dCTP. Это в свою очередь приводит к подавлению синтеза ДНК (рис. 12.3), причем это подавление снимается добавлением в ростовую среду дезоксицитидина в концентрации 5—10 мкМ (рис. 12.4). Подавление становится заметным, когда концентрация тимидина в ростовой среде превышает 10^{-6} М, и полным при концентрации тимидина выше 3 мМ, что лежит в основе одного из методов синхронизации клеток (см. гл. 10).

4. Эндогенно синтезируемый dTTP снижает удельную радиоактивность ^{3}H-TTP, образующегося из добавленного ^{3}H-тимидина. При добавлении тритированного тимидина в концентрации $3 \cdot 10^{-8}$ М большая часть тимина в новообразованной ДНК синтезируется эндогенно, или по пути de novo, но когда концентрация ^{3}H-тимидина в среде повышается до 0,3 мМ, то он оказывается источником более чем 90% тимина клеточной ДНК (Cleaver, Holford, 1965; Cooper et al., 1966; Cleaver, 1967).

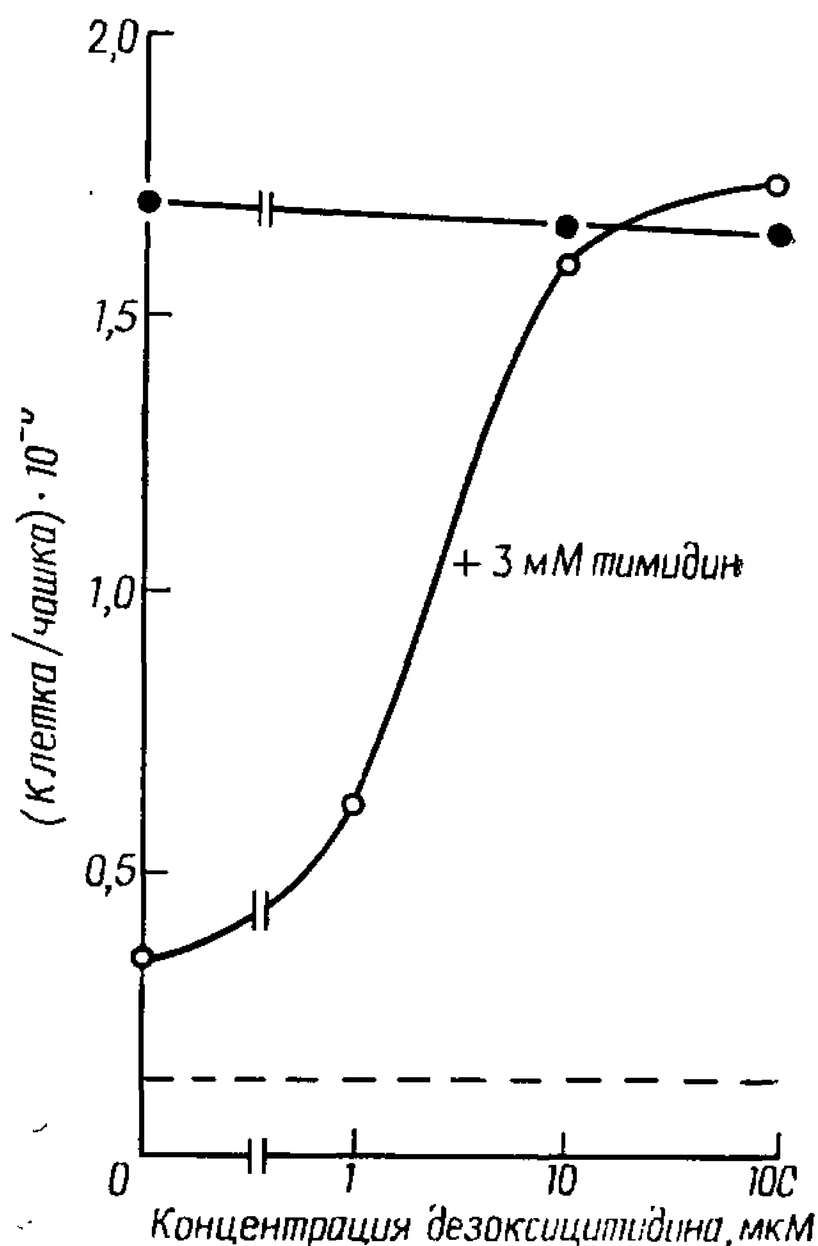


Рис. 12.4. Обращение дезоксицитидином ингибирующего действия тимидина. Клетки СНО высевали в чашки Петри диаметром 5 см ($0{,}13\cdot10^6$ клеток в 5 мл МСИ, содержащей двойную концентрацию витаминов, 10% сыворотки теленка и пролин в концентрации 57,5 мг/л). Через 4 суток клетки собирали и просчитывали их количество в счетчике Коултера. ●——● контроль; О——О тимидин (3 мМ), присутствует в среде в течение всего времени инкубации. Указанные концентрации дезоксицитидина использовались как в опытных, так и в контрольных чашках. Пунктиром показана начальная плотность клеток.

Поскольку удельная радиоактивность ^{3}H-dTTP является одним из факторов, определяющих количество включающейся в ДНК радиоактивности (либо в общем количестве импульсов в минуту, либо в числе зерен серебра на радиоавтографах), и поскольку эта удельная радиоактивность может меняться в зависимости от концентрации тимидина в среде и от состояния клеток, то количественное определение скорости синтеза ДНК по включению ^{3}H-тимидина таит в себе множество подводных камней.

5. Концентрация эндогенного синтезируемого dTTP изменяется в течение клеточного цикла. Так, в покоящихся клетках и клетках, находящихся в фазе G1, пул dTTP невелик (около 3 пмоль/10^6 клеток), но он увеличивается в течение фаз S и G2, достигая максимального уровня в митозе (Adams et al., 1971; Skoog et al., 1973; Walters et al., 1973). Этот dTTP локализован преимущественно в ядрах (Adams, 1969a; Adams et al., 1971; Skoog, Bjursell, 1974) и вызывает различной степени снижение удельной радиоактивности ^{3}H-dTTP, образующегося из экзогенного ^{3}H-тимидина.

12.1.1. Решение проблемы

Существует три пути преодоления этих проблем:

1) насытить пул dTTP экзогенным ^{3}H-dTTP;

2) блокировать эндогенный пул синтеза;
3) оценить вклад эндогенного dTTP в тимин ДНК.

12.1.1.1. Насыщение пула

При измерении включения тимидина в ДНК мышиных L-клеток при различных концентрациях ^3H-тимидина в среде оказалось, что при концентрации около 10^{-5} включение тимидина достигает плато (Cleaver, 1967). Аналогичные результаты были получены при использовании клеток СНО (рис. 12.5). Полу-

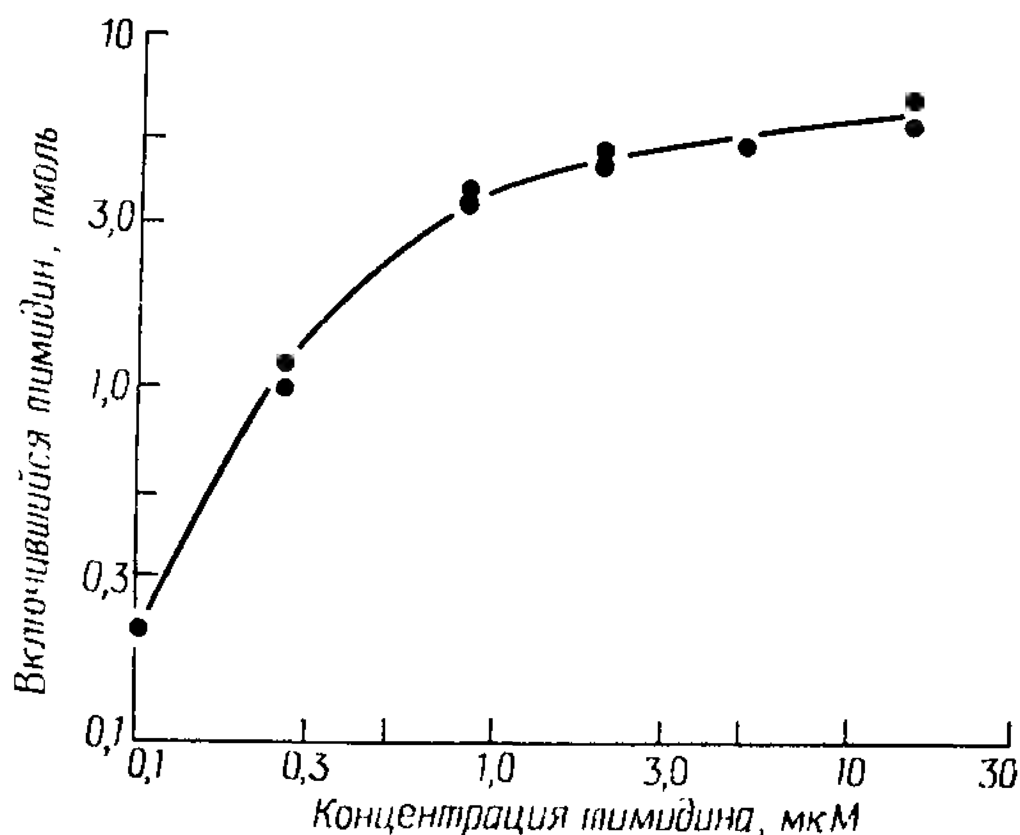


Рис. 12.5. Влияние концентрации тимидина на включение. Клетки СНО инкубировали с указанными концентрациями радиоактивного тимидина и определяли его включение в ДНК (более подробно см. подпись к рис. 12.6).

ченные результаты дают основание думать, что при этой концентрации тимидина (10^{-5} М) вклад эндогенного dTTP в тимин ДНК пренебрежимо мал. Следует обращать внимание, однако, чтобы вызываемое высокими концентрациями тимидина подавление рибонуклеотидредуктазы не приводило бы к ограничению поступления dCTP (разд. 11.8.3). Эксперименты лучше проводить с $5 \cdot 10^{-5}$ или $10 \cdot 10^{-5}$ М тимидином в присутствии 5—10 мкМ дезоксицитидина.

Пример

— Чашки диаметром 5 см, содержащие по $6 \cdot 10^5$ клеток L929 в 5 мл МСИ с 10% сыворотки теленка и забуференной Hepes, инкубировать в течение ночи.
— Не давая клеткам охлаждаться, добавить 50 мкл раствора, содержащего ^3H-тимидин (50 мкКи/мкмоль) и дезоксицитидин, до конечной концентрации соответственно 10^{-4} М (5 мкКи/мл) и 10^{-5} М.

— Для поддержания температуры чашки следует хранить внутри увлажняемого контейнера в термостатированной (37 °С) комнате. После 60 мин прекратить включение, промывая клетки в чашках:
 а) холодным СБСР (дважды),
 б) холодной 5%-ной ТХУ (4 раза),
 в) абсолютным этанолом (дважды).
— Высушить на воздухе и обработать клетки в 1 мл 0,3 н. NaOH, прогревая в случае необходимости до 37 °С.
— Перемешать содержимое чашки и перенести 0,5 мл во флакон для счета сцинтилляций.
— Нейтрализовать 0,1 мл 1,5 н. HCl и добавить 6 мл толуольно-тритонового сцинтиллятора (0,5% дифенилоксазола в смеси толуола и тритона Х-100 в соотношении 2 : 1) и определить радиоактивность.

12.1.1.2. Блокирование эндогенного пути синтеза

Было показано (Stiegers et al., 1974), что в присутствии аметоптерина (10 мкМ), гипоксантина (30 мкМ) и глицина (100 мкМ) синтез ДНК может быть оценен по включению тритированного тимидина при концентрации последнего 3—30 мкМ. Скорость включения оказывается линейной, и оценки, основанные на удельной радиоактивности включающегося тимидина, совпадают с оценками количества синтезированной ДНК, полученными другими методами. Более того, присутствие аминоптерина не влияет на скорость пролиферации, продолжительность клеточного цикла и продолжительность фазы S.

Включение радиоактивности в ДНК в этих условиях происходит с постоянной скоростью в период между 30 и 90 мин после добавления антиметаболита и тритированного тимидина, и в течение этого периода удельная радиоактивность кислоторастворимого нуклеотидного пула остается постоянной и равной удельной радиоактивности ^{3}H-тимидина среды.

Пример

— Установить культуру клеток хомячка СНО в стеклянных сцинтилляционных флаконах ($2 \cdot 10^{5}$ клеток в 1 мл МСИ, содержащей 10% сыворотки теленка, гипоксантин (30 мкМ) и глицин (100 мкМ) и забуференной буфером Hepes).
— После культивирования в течение ночи добавить 50 мкл раствора аметоптерина ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и тритированного тимидина ($2 \cdot 10^{-4}$ М, 0,3 мкКи/мкмоль).
— Через 15 мин инкубации фиксировать клетки во флаконах в следующей последовательности:
 а) промыть дважды холодным СБСР (5 мл),
 б) промыть 4 раза холодной ТХУ (5 мл),

в) промыть дважды этанолом (5 мл),
г) промыть эфиром (5 мл) и высушить на воздухе.

— Растворить клетки в 0,3 мл гиамингидроксида (в случае необходимости прогреть при 60 °С в течение 10 мин), добавить 5 мл толуольного сцинтиллятора (0,5% дифенилоксазола в толуоле) и определить радиоактивность.
— Из радиоактивности после 90 мин инкубации вычесть радиоактивность, наблюдавшуюся после 30 мин инкубации, или просто определить радиоактивность после 60 мин инкубации, если включение было линейным, начиная с нулевого момента времени.

12.1.1.3. Оценка эндогенного дезокси dTTP (Adams, 1969b)

Главные проблемы в вопросе о насыщении пула связаны с предположением о том, что выбранные концентрации тимидина а) достаточно велики, чтобы насытить пул, и вместе с тем б) достаточно низки, чтобы не оказать повреждающего действия на рост клеток.

Скорость включения радиоактивности зависит от удельной радиоактивности ^{3}H-dTTP, которая, согласно двум предыдущим методам, предполагалась равной удельной радиоактивности экзогенного ^{3}H-тимидина. При увеличении концентраций ^{3}H-тимидина от низких значений (менее 10^{-6} М) увеличиваются также удельная радиоактивность пула ^{3}H-dTTP и включение радиоактивности в ДНК. Эти изменения происходят на фоне неизменной истинной скорости синтеза ДНК. Следовательно, часть пула dTTP, содержащего радиоактивность [^{3}H-dTTP]/([dTTP] + + [^{3}H-dTTP]) равна части содержащего радиоактивность тимина в ДНК (^{3}H-тимин/общий тимин).

Это равенство может быть записано в следующем виде:

$$\frac{1}{^3\text{H-тимин}}=\frac{[\text{dTTP}]}{\text{Общий тимин}}+\frac{1}{^3\text{H-dTTP}}+\frac{1}{\text{Общий тимин}}.$$

Это уравнение описывает прямую линию, пересекающую ось ординат в точке, представляющей собой обратную величину скорости синтеза ДНК. Более того, при равенстве эндогенного и экзогенного пулов трифосфата (dTTP и ^{3}H-dTTP) скорость включения трития оказывается полумаксимальной, что позволяет вычислить величину пула эндогенного dTTP. В основе всех этих рассуждений лежит предположение о том, что пул кислоторастворимых дезокситимидилатов состоит преимущественно из dTTP.

Пример

— Установить культуру мышиных клеток L929 на покровных стеклах в культуральной пластинке с 24 лунками. В каждую

лунку внести $2 \cdot 10^5$ клеток в 0,5 мл среды Игла с 10% сыворотки теленка и инкубировать в течение ночи.

— В каждую лунку добавить 10 мкл раствора, содержащего 2 мкКи ^{3}Н-тимидина в следующих концентрациях: 25 мкМ, 50, 100, 200, 300, 500, 700 мкМ и 1 мМ.

— Инкубировать 60 мин, после чего извлечь покровные стекла и промыть их, окуная последовательно в три сосуда с ледяным СБСР.

— Поместить покровные стекла в сцинтилляционные флаконы, добавить в каждый по 0,5 мл холодной 5%-ной ТХУ и оставить на 10 мин.

— Извлечь покровные стекла и промыть последовательно в 4 сосудах с 5%-ной ТХУ и двух сосудах с абсолютным этанолом.

— Поместить покровные стекла в свежие сцинтилляционные флаконы, добавить по 0,3 мл гиамингидроксида для раство-

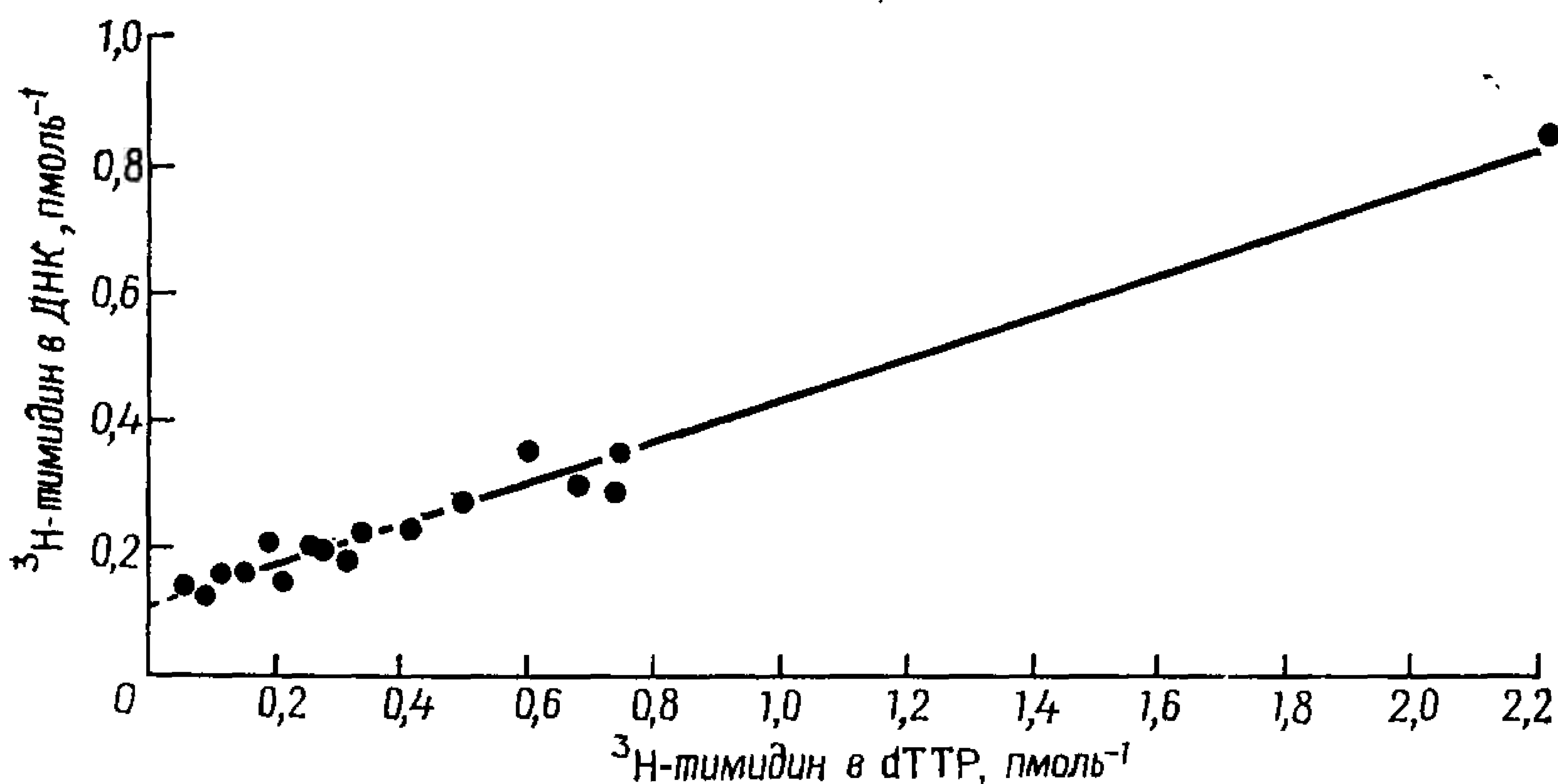


Рис. 12.6. Доступность эндогенного dTTP. 10^5 клеток СНО в 0,5 мл МСИ (модификация Глазго), дополненной пролином и 10% сыворотки теленка, вносили в каждую лунку пластинки для культуры клеток. Около половины клеток прикрепляются к покровным стеклам в лунках, и, судя по результатам радиоавтографического анализа, 30% клеток синтезируют ДНК. В каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора, содержащего 0,5 мкКи ^{3}Н-тимидина, так, чтобы конечная концентрация тимидина варьировала в пределах от 0,1 до 15 мкМ. После 40 мин инкубации при 37 °С покровные стекла с клетками удаляли и определяли включение радиоактивности в ДНК и в кислоторастворимый материал (dTTP). Строили график зависимости обратных значений этих величин и через экспериментальные точки проводили прямую методом наименьших квадратов. Коэффициент корреляции составляет 0,99. Пересечение прямой с осью ординат дает скорость включения тимидина в ДНК (8,9 пмоль/40мин)/ /$5 \cdot 10^4$ клеток или (0,97 мкг ДНК/ч)/10^6 клеток в фазе S. Исходя из размеров тритированного кислоторастворимого пула при полумаксимальном включении, можно рассчитать размер пула эндогенного dTTP (62,5 пмоль/10^6 клеток). При объеме 10^6 ядер, равном 0,1 мкл, это соответствует концентрации 0,63 мМ.

рения клеток и затем по 5 мл толуольного сцинтиллятора и определить радиоактивность ^{3}H-тимина в ДНК.

— К экстракту холодной ТХУ со стадии 4 добавить 5 мл толуольно-тритонового сцинтиллятора для измерения включения трития в кислоторастворимый пул (^{3}H-TTP).

— Полученные результаты (имп./мин) перевести в распады/мин и затем в пикомоли, принимая во внимание изменяющуюся удельную радиоактивность тритированного тимидина.

— Построить зависимость обратной концентрации ^{3}H-тимина от обратной концентрации ^{3}H-dTTP и экстраполировать к оси ординат для получения полного значения обратных концентраций тимина (рис. 12.6). Точка на оси абсцисс, соответствующая двойному содержанию общего тимина, представляет собой количество эндогенно синтезируемого dTTP в клетках.

Известен также кинетический подход к оценке размеров пула ДНК (Wittes, Kidwell, 1973). В этом случае клетки непрерывно инкубируют с 10 мкМ тритированного тимидина до тех пор, пока не будут мечены 20% остатков тимидина в ДНК. При этой концентрации клеток L929, растущих в суспензии, превращение внеклеточного тимидина в dTTT в фазе S составляет 9,5 пмоль/мин на 10^6 клеток.

12.1.1.4. Сравнение методов

Ни один из методов нельзя считать полностью удовлетворительным. Первые два метода включают в себя добавление агентов, предназначенных изменять метаболизм клеток, а третий метод непригоден для радиоавтографического анализа. Тем не менее каждый из методов является попыткой решения проблем, которыми многие исследователи зачастую пренебрегают.

12.1.2. Применение к суспензионным культурам

При работе со суспензионными культурами промывание клеток кислотой следует проводить путем повторного центрифугирования, но это трудоемко и может приводить к потере клеточного материала, если не принять необходимых мер предосторожности. Вместо этого можно осадить клетки на стеклянные или ацетатцеллюлозные фильтры, установленные в держателях фильтров для микроанализа (Millipore Corp. Ltd.), либо осажденные центрифугированием клетки можно растворить в небольшом известном количестве 0,3 н. NaOH. Аликвоты растворенных клеток высушивают затем на бумажных дисках Ватман 5 ММ диаметром 2,5 см и сразу несколько дисков проводят через сосуды с 5%-ной ТХУ (4 раза), этанолом (дважды) и эфиром.

Клеточный материал на бумажных и стеклянных фильтрах можно затем растворить с помощью гиамингидроксида и его радиоактивность определить в толуольном сцинтилляторе.

12.2. Оценка скоростей синтеза РНК и белка

В качестве специфического предшественника РНК используется обычно 5-^{3}Н-уридин, но при этом значительная часть радиоактивности может включаться в ДНК, особенно в форме цитозина (Adams, 1968; Oldham, 1967). Многие проблемы, рассмотренные нами при анализе включения ^{3}Н-тимидина, возникают также и при использовании ^{3}Н-уридина, но в этом направлении проведено очень мало скрупулезных исследований.

Синтез белка исследуют обычно с помощью радиоактивных аминокислот. Процедура, как правило, сходна с той, которая используется для изучения синтеза ДНК, но в первом случае ростовая среда клеток уже содержит высокие концентрации аминокислот, так что добавляемые радиоактивные аминокислоты служат маркерами, не нарушая нормального роста клеток. Однако, когда бывает необходимо увеличить включение радиоактивности, присутствие в среде немеченых аминокислот может этому мешать, и их концентрация должна быть снижена. Сильное снижение концентрации оказывает на клетки явное повреждающее действие (разд. 11.7), так что следует провести предварительный анализ минимальной концентрации аминокислоты, к которой клетки будут толерантны в данных экспериментальных условиях.

Если мышиные клетки L929 пересеять из стационарной культуры в среду без метионина, то клетки не вступают в фазу S, и даже 10%-ная по сравнению с нормальной концентрация метионина может оказывать серьезное действие (Turmbull, Adams, 1975). Если же клетки вступили в фазу S, то синтез ДНК может продолжаться при фактическом отсутствии метионина, но ДНК и, по-видимому, другие синтезируемые полимеры будут недостаточно метилированы.

Было показано (Taylor, Stanners, 1967), что крупные полирибосомы начинают дезагрегировать в течение 10 мин после снижения концентрации валина в среде до 5% от нормальной. Это приводит к снижению скорости синтеза белка, измеряемой с использованием многих меченых аминокислот. Следовательно, хотя при том же расходе меченой аминокислоты включение радиоактивности при использовании недостаточной среды может возрастать, в пересчете на молярную концентрацию оно будет снижаться.

12.3. Радиоавтография

β-Частицы, возникающие при распаде трития, обладают низкой энергией и поэтому идеально подходят для радиоавтографии высокого разрешения. Зерна серебра обычно располагаются на расстоянии 0,1—0,5 мкм от источника β-частиц трития, тогда как в случае β-частиц ^{14}C это расстояние достигает 290 мкм (Cleaver, 1967). Действительный диапазон зависит от энергии отдельной β-частицы и плотности материала, через который она проходит, так что ^{14}C может быть использован только в тех случаях, когда требуемое разрешение ниже 20 мкм.

Обеспечивая высокое разрешение, низкая энергия β-частиц трития создает свои проблемы. Толщина фиксированных клеток оказывается, как правило, не ниже 2 мкм, так что только часть испускаемых β-частиц проходит через клетку и достигает радиоавтографической эмульсии. В результате самопоглощения β-частиц клетками и вследствие того, что по крайней мере половина β-частиц испускается в направлении, противоположном эмульсии, на образование каждого зерна серебра в эмульсии приходится около 19 распадов ядер трития (Cleaver, Holford, 1965).

β-Частицы, испускаемые под углом и проходящие через более толстый слой биологического материала, никогда не достигают эмульсии. Одно из преимуществ низкоэнергетических β-частиц трития заключается в том, что эти частицы, достигая эмульсий с повышенной плотностью, задерживаются в ней на расстоянии 0,15—1 мкм. Следовательно, при эмульсиях толще 1 мкм их толщина не оказывает существенного влияния на чувствительность (Doniach, Pelc, 1950).

С другой стороны, высокая энергия β-частиц, испускаемых ^{14}C, обеспечивает их прохождение через эмульсию в среднем на 10 мкм, так что увеличение толщины эмульсии, снижая разрешение, увеличивает число образующихся зерен серебра. Это делает возможным применение метода двойной метки, когда ДНК клеток метят ^{3}H- и ^{14}C-тимидином и покрывают двумя слоями эмульсии (Baserga, 1961; Dawson et al., 1962). Нижний слой содержит зерна, «засвечиваемые» β-частицами как от ^{3}H, так и от ^{14}C, но только последние могут «засвечивать» зерна в верхнем слое. Фокусируя объектив микроскопа на тот или иной слой, можно выявить клетки, меченные только ^{14}C. С помощью этого метода измеряли вступление клеток в фазу S и выход из этой фазы (Lala, 1968).

12.3.1. Эмульсии

Чувствительность и разрешение радиоавтографического метода зависят от используемой эмульсии. Эмульсии поставляются в двух формах: а) в форме геля, который необходимо расплавить

и развести перед обмакиванием в него препаратов и б) в виде заранее приготовленных пленок, которые следует отделить от стеклянных пластинок, поместить на поверхность воды и перенести на препарат. К первой форме относятся эмульсии Илфорд L4 и Кодак NTB3, а ко второй — эмульсия Кодак AR10 (приложение 3). Размер зерен в этих эмульсиях варьирует от 0,12 мкм (Илфорд L4) до примерно 0,4 мкм (Кодак AR10), и каждая β-частица, проходя через эмульсию, может образовывать от 0,5 зерен (пленки Кодак) до 1,3 зерен (Илфорд L4) (Caro, 1966). Использование отделяемых пленок широко распространено, но этот метод более трудоемок, требует большей затраты времени и часто не дает каких-либо значительных преимуществ при тритиевой радиоавтографии. Вместе с тем постоянство толщины пленок является важным преимуществом при количественной радиоавтографии соединений, меченных ^{14}C.

12.3.2. Отделяемые пленки

1. Покровные стекла с растущими на них мечеными клетками монтируют клетками вверх на предметном стекле, используя клей DePex (Gurr; приложение 3). Для улучшения результатов предметные стекла следует предварительно окунуть в 0,5%-ный раствор желатина, содержащий 0,05% хромоалума, и высушить на воздухе.
2. Все следующие работы следует проводить в темной комнате, используя безопасный красный свет.
3. Пластинки с отделяемой пленкой (12,1×16,5 см) нарезать с помощью острой бритвы. Полосы шириной 1 см с каждой стороны пластины отбросить, а среднюю часть разрезать на 8 квадратов.
4. Через несколько минут после разрезания кусочки отделяемой пленки сворачиваются. Их следует удалить с помощью скальпеля и корнцанга и расправить на поверхности чистой дистиллированной воды при 20 °С.
5. Выдержать пленки в течение трех минут. За это время пленки набухают и расплавляются.
6. Погрузить предметные стекла с клетками под воду и поднять их таким образом, чтобы пленка оказалась над клетками. Свисающие концы пленки пристают к нижней поверхности стекла.
7. Промыть и высушить в струе холодного воздуха.
8. Экспонировать и проявить, как указано ниже. Главной трудностью при использовании отделяемых пленок является возможность их смещения относительно препарата в ходе подготовки. Этого можно избежать, обеспечив адекватное набухание (стадия 5) и высушивание.

12.3.3. Жидкая эмульсия

1. Смонтировать покровные стекла с клетками на предметном стекле, как указано выше. В использовании покрытых желатиной стекол необходимости нет.
2. В темной комнате расплавить эмульсию, помещая бутыль с гелем в водяную баню при 40 °С. Этот процесс довольно длителен, и его не следует часто повторять с одним и тем же препаратом эмульсии. Поэтому следует внести по 5—10 г твердого геля в отдельные универсальные флаконы и хранить их отдельно, расплавляя по мере надобности эмульсию в одном из флаконов.
3. Разбавить жидкую эмульсию одним или двумя объемами дистиллированной воды. Избегать встряхивания и интенсивного перемешивания в связи с опасностью образования пузырьков.
4. Погрузить препараты в разведенную эмульсию. Если покровное стекло смонтировано на конце предметного, то глубина погружения в жидкую эмульсию может не превышать 2—3 см.
5. Дать стечь избытку эмульсии и высушить препараты в токе холодного воздуха. Высушивание в горизонтальном положении приводит к образованию более толстого слоя эмульсии. При использовании более разведенных эмульсий высушивание в вертикальном положении позволяет получать слои эмульсии толщиной менее 1 мкм.
6. Радиоавтографы лучше экспонировать в светонепроницаемом ящике в течение 3—7 дней. Сообщалось, что более длительное экспонирование приводит к диссипации латентного изображения, если только не хранить высушенные радиоавтографы при низкой температуре в бескислородной атмосфере. Для этого в светонепроницаемый ящик с радиоавтографами помещают пенал с влагопоглотителем и кусок сухого льда. После этого ящик обматывают липкой лентой и хранят в холодильнике.

   Примечание. Обратить внимание, чтобы в том же холодильнике не хранились источники высокоэнергетического излучения, например ^{32}P. Если толщина эмульсионного слоя превышает 1 мкм, то число зерен серебра в нем линейно увеличивается в течение 9 сут, даже если препараты хранятся при комнатной температуре в атмосфере воздуха (рис. 12.7).
7. После экспонирования инкубировать предметные стекла в проявителе Кодак D19b при 20 °С в течение 3—5 мин.

   Этот проявитель можно изготовить, растворяя следующие вещества в указанном порядке: 2,2 г метола (Ilford Std., приложение 3); 144 г гидрохинона; 48 г безводного карбоната натрия; 4,0 г бромида калия.

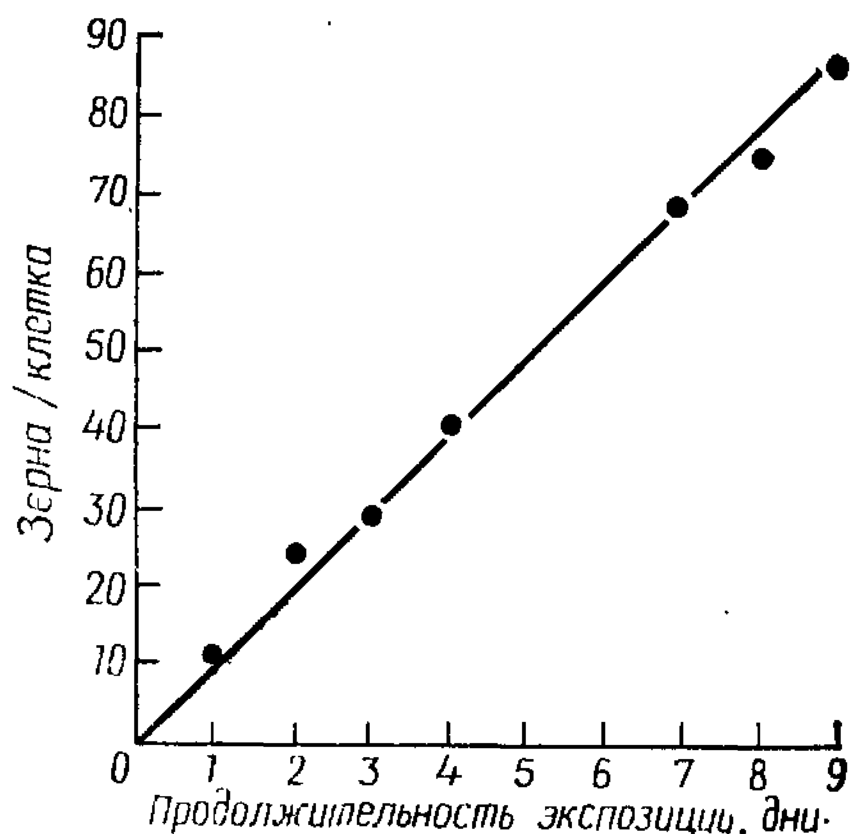


Рис. 12.7. Влияние продолжительности экспонирования при радиоавтографии на число зерен. Клетки BHK21/C13, меченные ^{3}H-уридином, покрывали эмульсией Ilford L4 (разведенной равным объемом дистиллированной воды). Стекла с клетками высушивали в горизонтальном положении и экспонировали на воздухе при комнатной температуре в течение указанного времени. (Печатается с разрешения K. Shaw и J. D. Pitts.)

Довести объем раствора до 1 л дистиллированной водой и хранить при 4 °C в ПОЛНОСТЬЮ (для предотвращения окисления) заполненной бутыли. Перед употреблением убедиться, что проявитель прогрет до 20 °C.

8. Фиксировать фиксажем Amfix (May and Baker; приложение 3), разведенным двумя частями воды, в течение 5 мин или в течение времени, вдвое превышающего время проявления, и промыть проточной водой.
9. Окрасить по Гимза в течение 3 мин и тщательно промыть проточной водой. Высушить на воздухе.
10. Заключить препарат под второе чистое предметное стекло, используя DePex. Если мечение не очень интенсивное, рекомендуется использовать масляную иммерсионную оптику.

12.3.4. Радиоавтография в чашках

Клетки, выращенные непосредственно в чашках (чашки Петри диаметром 5 см), могут быть мечены радиоактивным предшественником и фиксированы так же, как и клетки на покровных стеклах. Затем в каждую чашку добавляют 1 мл разведенной эмульсии и препараты экспонируют (без крышки) и проявляют, как указывалось выше.

12.3.5. Значимость подсчета числа зерен

Радиоавтографический анализ — единственный метод, с помощью которого можно определить долю клеток, включающих радиоактивный предшественник, и локализацию этого включения. Так, тритированный тимидин включается в ДНК ядер клеток, находящихся в фазе S, а тритированный гипоксантин появля-

ется вначале в ядрах, а затем в цитоплазме клеток с активностью гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы, но не в мутантных клетках, лишенных этого фермента (разд. 13.1).

Подсчет числа зерен как количественный показатель скорости или интенсивность того или иного процесса, например синтеза ДНК, обладает многими из тех недостатков, которые отмечались для измерения общего включения радиоактивности в культивируемые клетки (разд. 12.1). Так, включающийся ^{3}H-тимидин разводится эндогенным dTTP, пул которого может быть различен у разных клеток. Кроме того, отсутствие точной зависимости между числом распадов и числом зерен означает, что по количеству зерен в лучшем случае можно определить лишь относительную скорость синтеза макромолекул. Тем не менее подсчет числа зерен является единственным путем сравнения скоростей включения предшественника в индивидуальные клетки.

Инкубация клеток с ^{3}H-тимидином позволяет определить не только относительное число клеток, участвующих в синтезе ДНК. Оказывается, что число зерен над клеткой варьирует в весьма широких пределах — более широких, чем можно было бы ожидать на основании статистического распределения. На рис. 12.8 показано распределение числа зерен сравнительно с

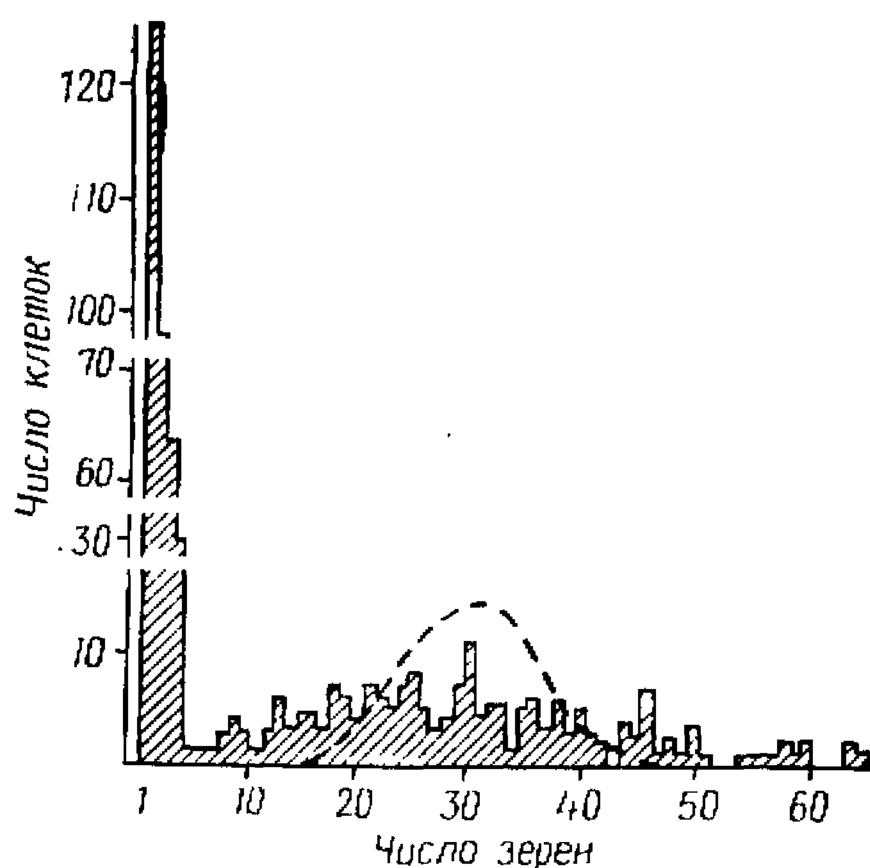


Рис. 12.8. Распределение числа зерен. L-клетки метили в течение 10 мин ^{3}H-тимидином (2,5 мкКи/мл; 0,36 Ки/ммоль) и готовили для радиоавтографического анализа с эмульсией NTB3. Подсчитывались клетки, над которыми обнаружилось 1 или более зерен серебра (62% всех клеток). Для сравнения показано распределение Пуассона со средним 30. [Перепечатано из (Cleaver, 1967) с любезного разрешения автора.]

распределением Пуассона со средним значением 30 зерен на клетку. Уширение распределения частично обусловлено клетками, выходящими из фазы S или вступающими в эту фазу в период мечения, но число таких клеток может быть снижено сокращением времени мечения. Другой причиной уширения распределения числа зерен является неравномерность скорости синтеза ДНК во время фазы S (разд. 10.3), а изучаемые популяции содержат клетки на всех стадиях синтеза ДНК.

12.3.6. Фоновое число зерен

На рис. 12.8 отчетливо выявляется группа «немеченых» клеток. Такие клетки содержат обычно менее чем одно зерно (в среднем) на клетку, и такое же число зерен обнаруживается над соответствующими участками предметных стекол, не содержащими клеток. Общепринято рассматривать число зерен над такими контрольными участками в качестве меры фонового счета.

Повышенный фоновый счет обнаруживается, когда 1) используется старая эмульсия, либо радиоавтографы экспонируются вблизи радиоактивных источников, таких, как ^{32}P; 2) увеличивается время экспозиций; 3) имеет место неадекватное удаление тритированных предшественников или кислоторастворимых компонентов.

12.3.7. Радиоавтография водорастворимых компонентов

В приведенных выше методах молекулы радиоактивных предшественников и кислоторастворимых промежуточных продуктов тщательно удаляли, чтобы снизить фоновое число зерен, обеспечив тем самым определение истинного включения радиоактивности в макромолекулы. Однако разработано несколько процедур для визуализации локализации водорастворимых компонентов внутри клеток. Начальным этапом всех этих методов является эффективное удаление внеклеточного радиоактивного материала путем интенсивной промывки клеток солевыми растворами. Неясно, однако, насколько такое промывание удаляет внутриклеточный материал, способный диффундировать из клеток в этих экспериментальных условиях. Так, в клетках, трижды промытых ледяной СБСР Игла, остается мало тритированного тимидина. Это может означать либо 1) отсутствие внутриклеточного тимидина, либо 2) быструю диффузию тимидина из клеток при промывке их СБСР. Следовательно, описанные ниже радиоавтографические процедуры могут обнаруживать заряженные молекулы, которые обычно выделяются из клеток лишь кислыми фиксаторами, например тимидинфосфаты, глюкозофосфаты и так далее.

12.3.7.1. Фиксация клеток

Выбор метода фиксации зависит главным образом от того, требуется ли установить точную локализацию предшественников, либо допустима или желательна некоторая диффузия растворимых компонентов. В последнем случае быстрое высушивание на воздухе (при 37 °С) клеток, меченных тритированным тими-

дином, позволяет тритированным тимидинфосфатам диффундировать на короткое расстояние, образуя ореол вокруг ядер (Adams, 1969a). Для точной локализации необходимо заморозить клетки в изопентане или фреоне, поддерживаемых при температуре жидкого азота, и затем лиофилизовать клетки. Процесс такого высушивания очень быстр вследствие малого размера клеток. Лиофилизацию можно осуществить, расположив предметное стекло с клетками на металлическом бруске, охлажденном до температуры жидкого азота, и поместив этот брусок в вакуумный эксикатор, подсоединенный к вакуумному насосу. Согласно другому методу, предметные стекла с клетками помещают в колбу, охлаждаемую смесью соли со льдом до —20 °С и соединенную с вакуумным насосом. В обоих случаях в системе должна присутствовать ловушка, охлаждаемая смесью метанол/сухой лед, для улавливания паров воды.

Вместо лиофилизации может быть проведено *замещение замороженных* клеток (Pease, 1953). После обработки клеток изопентаном при температуре жидкого азота их промывают несколькими сменами абсолютного метанола при температуре твердого CO_2 в течение 2—3 ч.

12.3.7.2. Покрытие эмульсией

И в этом случае, если допустима некоторая диффузия, предметные стекла с фиксированными клетками погружают в жидкую эмульсию и быстро высушивают в горизонтальном положении (Adams, 1969a). Высушивание в вертикальном положении приводит к появлению хвостов зерен, направленных от клеток, что объясняется вымыванием растворимых радиоактивных соединений жидкой эмульсией.

Фитцджеральд и др. (Fitzgerald et al., 1961) охлаждали фиксированные стекла в рефрижераторе, так что после переноса их в теплую темную комнату на поверхности стекол образовался слой конденсата. Этого слоя оказывается достаточно, чтобы удержать квадрат сухой отделяемой пленки, прижав его большими пальцами рук. Фиксированная на этой стадии пленка обычно набухает в ходе проявления, что приводит к заметному сдвигу пленки относительно клеток.

Чтобы избежать проблемы ненабухающей отделяемой пленки и снизить до минимума диффузию, к фиксированным стеклам можно добавлять частично высушенную жидкую эмульсию (Miller et al., 1964a; Finbow, Pitts, 1979).

— Поместить небольшое количество разбавленной жидкой эмульсии в чашку Петри диаметром 9 см при 44 °С и дать ей охлаждаться, пока она не станет застывать.
— Опустить в эмульсию проволочную петлю диаметром около 8 см и вынуть ее вместе с захваченной эмульсией.

— Поместить петлю на предметное стекло, лежащее на горизонтальной поверхности. Эмульсия образует четкий круг вокруг стекла.
— Высушить в токе холодного воздуха и обработать, как указано выше.

12.4. Репарация ДНК

Включение тритированного тимидина в ДНК в результате репарации редко оказывается существенным при изучении синтеза ДНК. Однако после облучения или в присутствии некоторых ядов, подавляющих репликацию ДНК, главной причиной включения тритированного тимидина может стать репарация поврежденной ДНК.

Репарацию ДНК лучше изучать в системах с низким фоновым уровнем репликации. Подходящими системами являются культуры, достигшие стационарной фазы при высокой плотности, или препараты нестимулированных лимфоцитов, в которых менее 1% клеток находится в фазе S. Низкий уровень репликативного включения может быть еще более подавлен гидроксимочевиной (1—2 мМ), избирательно подавляющей репликацию (Cleaver, 1969b). Избирательность действия, возможно, объясняется просто очень малым пулом дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, требующихся для репаративного синтеза.

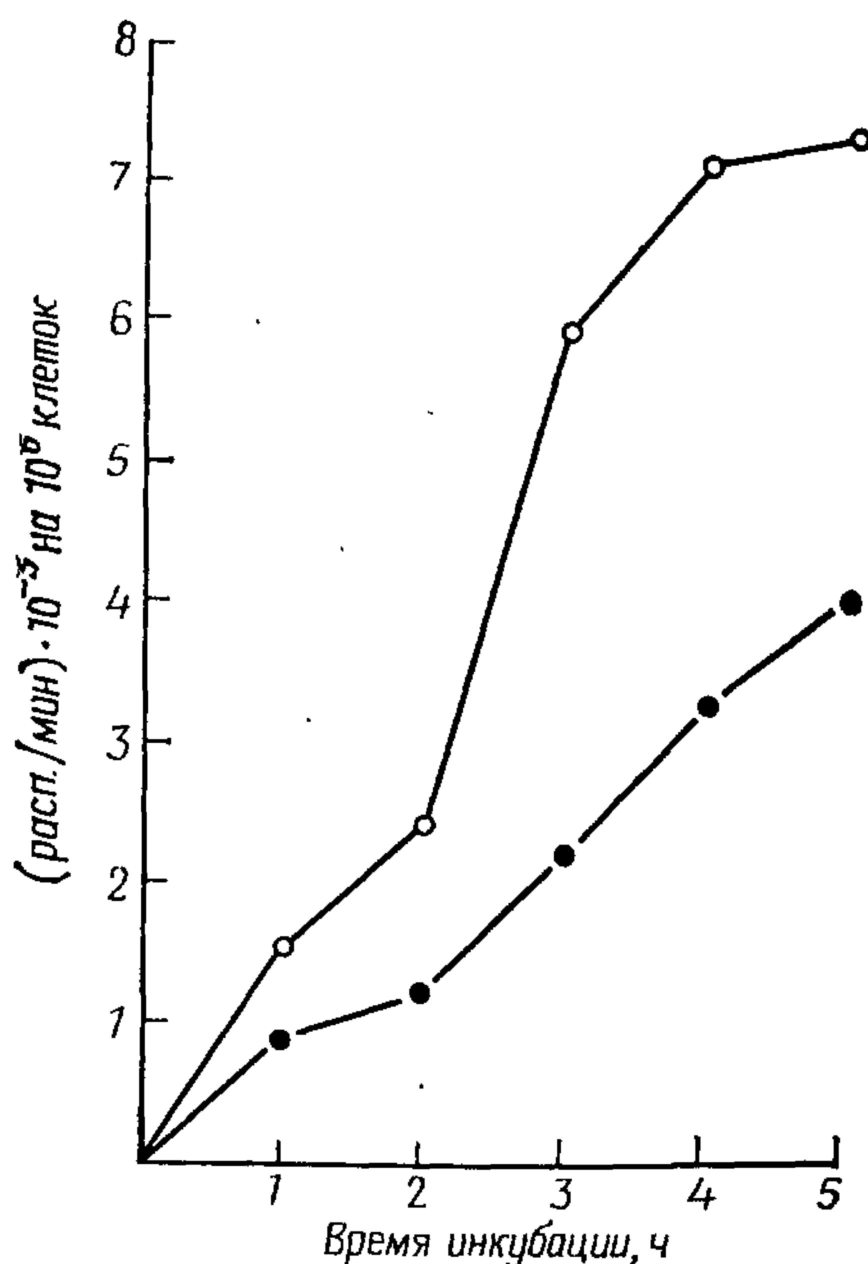


Рис. 12.9. Динамика включения ^{3}H-тимидина в ДНК УФ-облученных и обработанных гидроксимочевиной лимфоцитов. $3 \cdot 10^6$ лимфоцитов от больного с лучевым кератозом (●) или здорового человека того же возраста (○) инкубировали с ^{3}H-тимидином (5 мкКи/мл; 18,5 Ки/ммоль) и гидроксимочевиной (1,5 мМ) при 37 °С сразу после облучения (20 Дж/м^2). После инкубации в течение различного времени клетки фиксировали по Карнуа и перед определением радиоактивности промывали 5%-ной ТХУ и этанолом. [Перепечатано из (Abo-Darub et al., 1978) с любезного разрешения авторов и издателей.]

Тот факт, что наблюдающееся в этих условиях включение объясняется репарацией ДНК, можно подтвердить мечением ^{3}H-бромдезоксиуридином в присутствии 1 мкМ фтордезоксиуридина и гидрооксимочевины. Если ДНК затем выделить и фракционировать равновесным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия, то метка обнаруживается в легкой незамещенной цепи (Cleaver, 1969а; Abo-Darub, 1977).

12.4.1. Ультрафиолетовое облучение

Подготовленные для облучения клетки должны образовывать монослой на пластиковой (прозрачной для ультрафиолета) чашке или бутыли в минимальном объеме ФСБ-А или другой жидкости, не поглощающей ультрафиолетовых лучей. Клетки подвергаются действию света с длиной волны 254 нм при дозе около 0,5 (Дж/м^2)/с на соответствующем расстоянии от источника (Abo-Darub et al., 1978). Энергию эмиссии источника можно определить с помощью химического актинометра (Hatchand, Parker, 1956), принцип действия которого заключается в том, что облучение раствора ферриоксалата калия приводит к высвобождению ионов железа в количестве, пропорциональном дозе ультрафиолетового облучения.

После облучения в культуры добавляют ростовую среду и культуры быстро возвращают в термостат.

12.4.2. Измерение репаративного синтеза

Прометить клетки ^{3}H-тимидином (5 мкКи/мл, 20 Ки/ммоль) в присутствии 1—2 мМ гидроксимочевины. После периода мечения определить включение метки в ДНК, как указывалось выше, либо подготовить клетки для радиоавтографического анализа; в этом случае нет необходимости в присутствии гидроксимочевины, поскольку клетки, находящиеся в фазе S, легко отличимы по очень высокому числу зерен. В культурах необлученных клеток обнаруживается менее 0,2 зерен на клетку, а в культурах, облученных дозой около 5 Дж/м^2, обнаруживается 15—20 зерен на клетку после 8-дневной экспозиции (Abo-Darub et al., 1978). На рис. 12.9 показана динамика репарации облученных лимфоцитов, полученных от здоровых людей и от больных с лучевым кератозом (заболевание, часто встречающееся в некоторых регионах, при котором образуются опухоли на участках кожи, открытых солнцу). В лимфоцитах больных с лучевым кератозом скорость репарации ДНК ниже, чем в нормальных лимфоцитах.

Глава 13

Клеточные мутанты и гибридные клетки

Главное преимущество бактерий для биохимического анализа — это доступность мутантных штаммов в сочетании с коротким временем генерации. Культивируемые клетки животных обладают относительно малым временем генерации по сравнению с самими животными, так что основные попытки были направлены на получение и отбор мутантных животных клеток и их использование при изучении генетики соматических клеток.

13.1. Ауксотрофные мутанты

В 1968 г. был предложен общий метод получения ауксотрофных мутантов (Kao, Puck, 1968). В основе этого метода лежали данные о том, что ДНК, содержащая 5-бромдезоксиуридин (BUdr), становится чувствительной к видимому свету флуоресцентной лампы. Эта чувствительность может быть использована для избирательной гибели прототрофов, растущих в рестриктивной среде, т. е. в среде, ограничивающей рост ауксотрофных или иных мутантов. Клетки, которые после обработки могут расти в полной среде, представляют собой ауксотрофных мутантов. Ниже приведены последовательные этапы получения ауксотрофных мутантов.

— Выращивать клетки в обогащенной среде, содержащей мутаген N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) в концентрации 0,5 мкг/мл или этилметансульфонат (ЭМС) в концентрации 200 мкг/мл в течение 16 ч.

— Перенести клетки в лишенную мутагенов обогащенную среду и инкубировать в течение нескольких генераций в условиях, обеспечивающих рост как прототрофов, так и мутантных ауксотрофов.

— Сменить полную ростовую среду на минимальную ограничивающую среду и инкубировать в течение времени, достаточного для истощения пула незаменимых метаболитов.

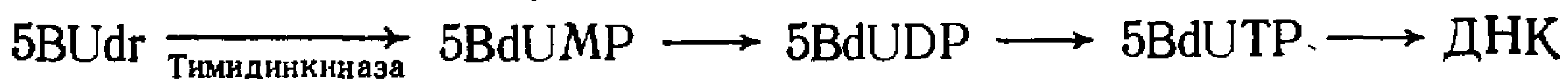
— Добавить в культуру BUdr (10^{-6} М). BUdr включается в ДНК прототрофов, которые являются единственными клетками, растущими в минимальной ограничивающей среде.

— После двух клеточных генераций удалить BUdr и экспонировать клетки в течение 30 мин в свете флуоресцентной лампы 40 В «Cool White» (General Electric). Это приводит к гибели прототрофов.
— Перенести клетки в полную обогащенную ростовую среду, обеспечивающую появление клонов ауксотрофных клеток через 1—2 недели.

13.2. Отбор мутантов

Мутанты, дефектные по тому или иному ферменту, могут быть отобраны при наличии двух условий: фермент не является незаменимым, а включение аналога природного субстрата приводит к летальному исходу.

Клетки, лишенные тимидинкиназы (клетки TK^-), можно выделить, обработав клеточные культуры высокими концентрациями (30 мкг/мл) 5-бромдезоксиуридина, который убивает клетки, содержащие фермент тимидинкиназу, в результате включения в клеточную ДНК большого количества аналога.



Мутанты, лишенные тимидинкиназы или с резко сниженной активностью фермента, могут служить примером клеток, для которых тимидинкиназа не является незаменимой. Клетки могут синтезировать dTMP из dUMP, используя фолиевую кислоту в качестве донора одноуглеродного фрагмента (рис. 13.1).

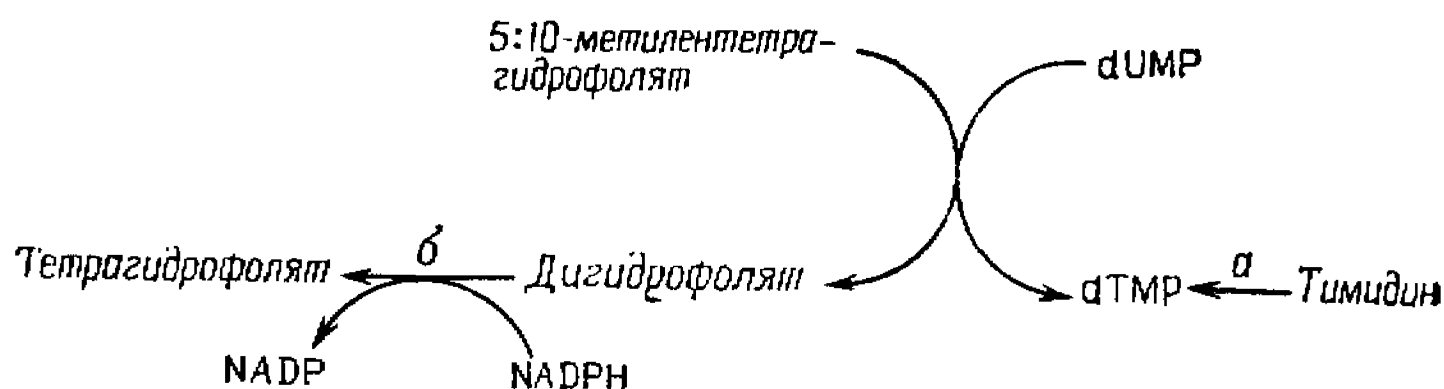


Рис. 13.1. Синтез dTMP. *а* — тимидинкиназа; *б* — дигидрофолятредуктаза.

Аналогичным путем мутанты, лишенные гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), могут быть выделены путем выращивания клеток в присутствии 8-азагуанина (3 мкг/мл). Этот аналог гуанина включается в пул пуриновых нуклеотидов, а следовательно, и в нуклеиновые кислоты под действием фосфорибозилтрансферазы, которая в норме участвует во включении гипоксантина или гуанина. И в этом случае выживают мутантные клетки, лишенные этого фермента. Фермент не является незаменимым, поскольку IMP может синтезироваться эндо-

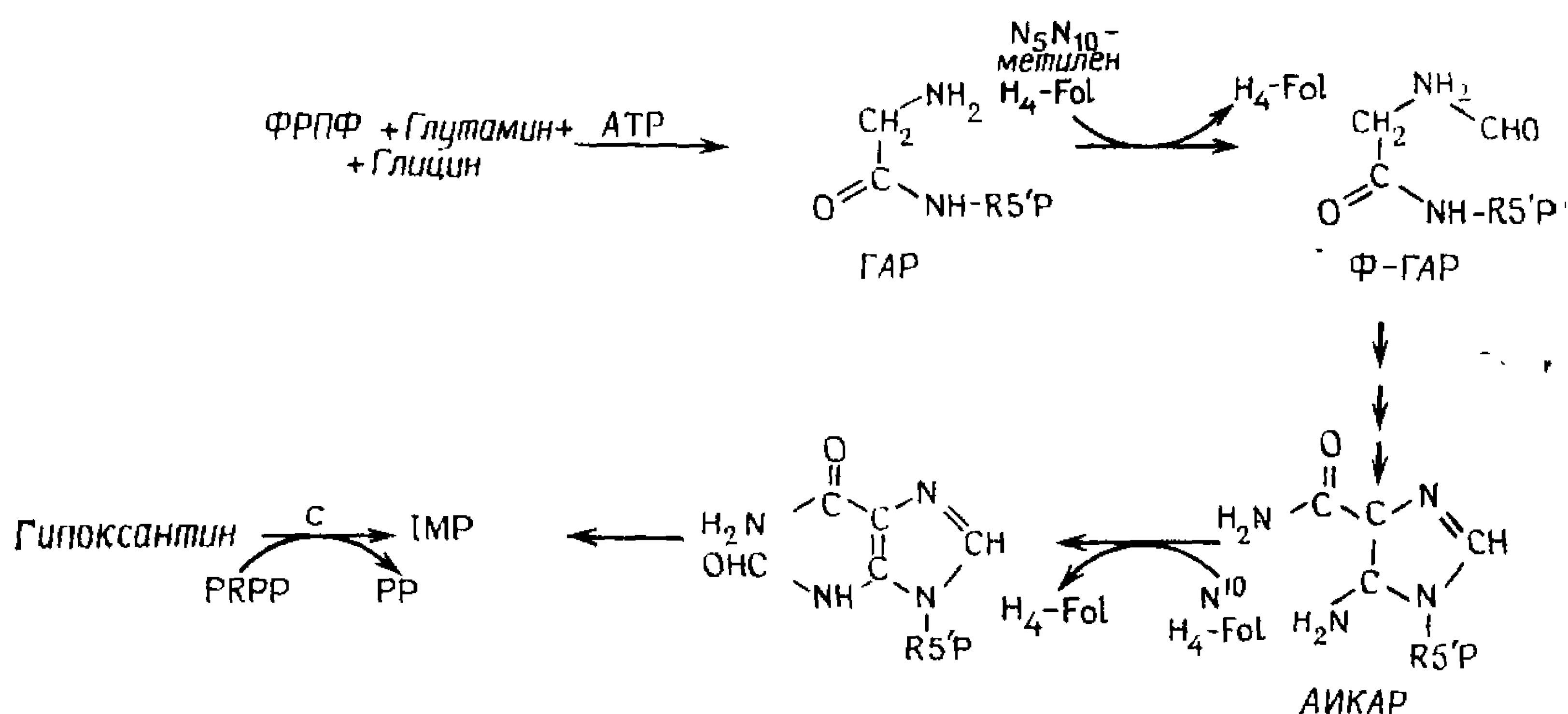


Рис. 13.2. Синтез IMP. *с* — гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза (ГФРТ); ГАР — глицинамидрибонуклеотид; ФГАР — формилглицинамидрибонуклеотид; ФРПФ — фосфорибозилпирофосфат; АИКАР — 5-аминоимидазол-4-карбоксиамидрибонуклеотид. H_4Fol — тетрагидрофолиевая кислота.

генно из более мелких субстратов. Два этапа эндогенного пути синтеза IMP используют фолиевую кислоту в качестве одноуглеродного донора для растущего пуринового кольца (рис. 13.2).

Аминоптерин и аметоптерин (метотрексат) представляют собой 4-аминозамещенные аналоги фолиевой кислоты (рис. 13.3). Эти соединения подавляют образование активных промежуточных продуктов, блокируя фермент дигидрофолятредуктазу (реакция *б*) и разрывая таким образом цикл (рис. 13.4).

Можно было бы ожидать, что действие антифолятов должно приводить к накоплению дигидрофолиевой кислоты, но это оказалось не так (McBurney, Whitmore, 1975), в связи с чем было высказано предположение о том, что антифоляты могут оказывать прямое ингибирующее действие как на фолят-зависимые ферменты, участвующие в биосинтезе пуринов, так и на тимидилат-синтетазу. Однако при выращивании клеток в присутствии возрастающих концентраций аминоптерина были выделены несколько резистентных клеточных линий (Hakala, Ishihara, 1962; Littlefield, 1969). Эти линии клеток характеризовались либо измененной проницаемостью, либо измененной фолятредуктазой, либо увеличенной скоростью синтеза, а следовательно, и активностью фермента (Alt et al., 1976), что было вызвано, по крайней мере частично, избирательной амплификацией гена дигидрофолятредуктазы (Alt et al., 1978; Schimke et al., 1978). Более подробно эта проблема рассматривалась в разд. 11.8.1. Важная роль антифолятов в технике НАТ-отбора (разд. 13.5) была использована (Littlefield, 1964) для выделения гибридов между мутантными клетками, дефектными, с одной стороны, по тимидинкиназе и с другой — по ГФРТ (см. ниже). Антифоляты

Фолиевая кислота

Аминоптерин (R=H) *и аметоптерин* (R=CH_3)

Рис. 13.3. Структура фолиевой кислоты и ее аналогов.

H_4-Fol
ФИ-Glu
Glu
Серин
Глицин
Метионин
Гомоцистеин
HCOOH
ATP
N^5-формимино-H_4-Fol
5OH-метил-H_4-Fol
N^5-метил-H_4-Fol
FAD
$FADH_2$
N^5-формил-H_4-Fol
NADPH
NADP
N^{10}-формил-H_4-Fol
N^5,N^{10}-метенил-H_4-Fol
N^5,N^{10}-метилен-H_4-Fol
ГАР
H_4-Fol
dUMP
H_2-Fol
б
АИКАР
Ф-ГАР
H_4-Fol
dTMP
Ф-АИКАР
IMP *и другие пуриновые нуклеотиды*

Рис. 13.4. Взаимопревращения производных тетрагидрофолиевой кислоты. H_2Fol — дигидрофолиевая кислота, H_4Fol — тетрагидрофолиевая кислота; АИКАР — 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид; Ф-АИКАР — формил-АИКАР; ГАР — глицинамидрибонуклеотид; ФГАР — формил-ГАР; Glu — глутаминовая кислота; ФИ-Glu — формиминоглутаминовая кислота. [Модифицировано из (Mudd, Cantoni, 1964).]

использовались также для подавления эндогенного пути при мечении клеток радиоактивными тимидином или гипоксантином (разд. 12.1.1.2), для синхронизации клеток истощением тимидинового пула (разд. 11.8.1) и в клинике для химиотерапии рака.

13.2.1. Процедура выделения ТК⁻-мутантов (Littlefield, Basilico, 1966)

— Посеять $5 \cdot 10^5$ клеток ВНК21/С13 в чашки диаметром 100 мм в среде Игла в модификации Дюльбекко, содержащей 10% сыворотки теленка, 10% триптозофосфата и бромдезоксиуридин в концентрации 3,3 мкг/мл. Это приводит к гибели большинства клеток в течение 10 суток и лишь около 20 клеток выживают и могут образовывать колонии.

— Собрать клетки и высеять их аналогичным образом, но при концентрации бромдезоксиуридина 30 мкг/мл. Это приводит к отбору высокорезистентных мутантов.

Через 10 дней образуются следующие 20 или около того клонов, у которых активность тимидинкиназы составляет 1—3% таковой в исходных клетках и которые характеризуются включением ^{14}С-тимидина в ДНК на уровне 5—7% от исходного.

13.3. Температурочувствительные мутанты

Общий метод выделения температурочувствительных мутантов (ts-мутантов) заключается в инкубации мутагенизированных клеток с агентом, оказывающим летальное действие на клетки, делящиеся при непермиссивной температуре. В качестве непермессивной температуры обычно выбирается 39 °С, но температура 37,5 °С часто бывает более удобной для снижения числа «слабых» (leaky) мутантов, т. е. мутантов, имеющих высокую частоту реверсий к нормальному фенотипу (Basilico, 1977, 1978; Talavera, Basilico, 1977).

К летальным агентам относятся соединения, индуцирующие несбалансированный рост путем подавления синтеза ДНК (фтордезоксиуридин или цитозинарабинозид), или агенты, включающиеся в ДНК и оказывающие повреждающее действие (высокие концентрации тритированного тимидина или бромдезоксиуридин, который при последующем облучении в ДНК индуцирует разрывы (Thompson et al., 1970). Как правило, выделенные мутанты оказываются температурочувствительными по синтезу ДНК (Sheinin, 1976; Nishimoto et al., 1978), но Базилико (Basilico, 1978) предложил следующие процедуры для отбора ts-мутантов по фазам G1 и G2.

1. Отбор мутантов по фазам G1 и *S*.

а. Мутагенизировать клетки, как указано в разд. 13.1.

б. Синхронизировать клетки в фазе G1 голоданием по изолейцину (разд. 11.7).
в. Снять блок при 39 °С (разд. 11.7) в присутствии 5 мкм 5-фтордезоксиуридина в течение двух суток, или
г. Снять блок при 33 °С в присутствии 2 мМ гидроксимочевины и спустя 10 ч инкубировать при 39 °С в течение 12—16 ч в среде без гидроксимочевины, но с 5-фтордезоксиуридином.

Этап *в* приводит к выходу мутантов по фазе G1, поскольку у мутантов по другим фазам начинается несбалансированный рост, и они гибнут. По тем же причинам этап *г* дает мутантов по фазе S.

2. *Отбор мутантов по фазам G2 и M.*
а. Мутагенизировать клетки, как указано в разд. 13.1.
б. Повысить температуру инкубации до 39 °С и инкубировать в течение времени генерации, что приводит к блокированию всех ts-мутантов.
в. Отделить митотические клетки (разд. 11.2), которые включают в себя мутантов, блокированных в митозе.
г. Инкубировать при 39 °С в течение времени генерации в присутствии фтордезоксиуридина, индуцирующего несбалансированный рост клеток дикого типа, приводящий к их гибели (разд. 11.8).
д. Снизить температуру до 33 °С и отобрать митотические клетки (разд. 11.2) в течение следующих 1—2 ч; эти клетки будут мутантами по фазе G2.

Во всех случаях клетки должны быть клонированы (разд. 8.1) и тестированы на эффективность процесса отбора.

13.4. Посев реплик животных клеток

Один из приемов, позволяющих бактериологу отбирать тысячи мутантов, основан на возможности переносить большое число клонов с одной чашки на другую, сохраняя их взаимное расположение. Используя этот прием, можно тестировать одновременно тысячи или более клонов по нескольким характеристикам роста и отбирать с исходных чашек интересующие клоны.

При работе с животными клетками возникают проблемы, связанные с тем, что клетки растут прочно прикрепленными к субстрату и в то же время двигаются по нему, так что выбранный клон быстро разрастается, занимая значительную поверхность. Недавно был предложен метод, позволяющий обойти эти проблемы (Esko, Raetz, 1978).

— Клеточные монослои обработать мутагенным агентом этилметансульфонатом (40 мкг/мл; Eastman Ltd.) и дать им расти в течение трех суток.
— Около 1000 клеток высеять в чашки Петри диаметром 10 см,

содержащие по 15 мл ростовой среды, и инкубировать в течение суток.
— Поместить диски стерильной бумаги ватман № 50 на поверхности жидкости и утопить их с помощью стеклянных бус так, чтобы они образовали одинарный ровный слой.
— Менять среду каждые 2—3 дня.
— После 7—8 дней отсосать среду, убрать бусы и удалить бумажные диски, к которым прикреплены более 95% клеток.
— Промыть бумажные диски струей среды (30 мл) для удаления маленьких комков клеток.
— Поместить диски с клетками (клетками вниз) на поверхности культуральной среды в свежих чашках, утопить их и инкубировать.
— Повторять последние 3 раза стадии каждые 3 дня, получая каждый раз чашки, являющиеся репликами исходной.

Клетки на бумажных дисках сохраняют жизнеспособность и могут быть использованы для радиоавтографического анализа. С другой стороны, они могут быть лизированы замораживанием и оттаиванием и инкубированы в ферментативном тесте.

Другим методом, приводящим к тому же результату, является посев мутагенизированных клеток в пластинку для микротитрования с 96 лунками, как для клонирования клеток. Когда колонии вырастут, клетки можно собрать и распределить между несколькими микротитровальными пластинками, используя ручные или автоматические сборщики клеток и разбавители, поставляемые Titertek (Flow Labs. Ltd.).

13.5. Гибридизация соматических клеток

Этот метод лежит в основе генетического анализа культивируемых клеток животных, и результаты исследований, публикуемых в журнале «Somatic Cell Genetics», получены, как правило, именно этим методом. В 1976 г. была опубликована монография, посвященная клеточным гибридам (Ringertz, Savage, 1976). Этот анализ является более грубым, чем генетический анализ у бактерий, но в настоящее время позволяет без труда локализовать отдельные гены в хромосомах. Традиционно такие исследования проводятся путем анализа потомков родителей, обладающих теми или иными фенотипическими характеристиками, но этот анализ был переведен на уровень биохимических признаков, после того как было показано, что в определенных условиях две клетки могут сливаться in vitro, образуя гетерокарион, т. е. одну клетку, содержащую два различных ядра. Небольшая часть таких клеток способна неограниченно размножаться. Первое митотическое деление после слияния приводит к появлению дочерних клеток с обоими наборами хромосом в одном ядре. Очень часто в ходе последующих делений вследствие

аномалий митоза происходит потеря хромосом поодиночке или попарно, пока не установится новая стабильная линия клеток, несущих те или иные хромосомы от каждого родителя (Weiss, Green, 1967; Ruddle, 1973; Glies, Ruddle, 1973). В гибридах клеток человека и мыши или китайского хомячка и мыши всегда сохраняются именно мышиные хромосомы (Matsuya, Green, 1969).

При работе с клеточными гибридами возникает необходимость, с одной стороны, уметь отбирать гибриды, и с другой — их идентифицировать. Наиболее простой комплементационный анализ включает в себя слияние клеток, различающихся по единичным мутациям. Так, если клетки, нуждающиеся для роста в глицине (gly^-), слить с клетками, нуждающимися для роста в гипоксантине (hyp^-), то, если мутации рецессивные, гетерокарионы смогут расти в среде, лишенной одновременно и глицина и гипоксантина. Это можно использовать для отбора продуктов слияния.

Аналогично, если мышиные клетки, лишенные тимидинкиназы и не растущие, следовательно, в присутствии аминоптерина и тимидина, слить с клетками человека, лишенными гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ) и не растущими в присутствии аминоптерина и гипоксантина, то только продукты слияния смогут расти в НАТ-среде, содержащей гипоксантин (10^{-4} М), аминоптерин ($4\cdot10^{-7}$ М) и тимидин (10^{-5} М) (Littlefield, Goldstein, 1970). Как указывалось выше, такие гетерокарионы преимущественно утрачивают хромосомы человека. Одна человеческая хромосома, которую гетерокарионы не могут утратить без потери способности к росту в среде НАТ, представляет собой хромосому, несущую ген тимидинкиназы. Отбирая различные клоны, получаемые при этом слиянии, и проводя анализ набора хромосом человека в клетках клонов, можно установить, какая хромосома является незаменимой, и, следовательно, локализовать хромосомное расположение гена тимидинкиназы (Weiss, Green, 1967).

С помощью этого метода было показано, что ген для ГФРТ локализован в Х-хромосоме. Этот результат лег в основу многих последующих исследований. Сейчас предпринимаются попытки сливать клетки, у одной из которых хромосомы фрагментированы облучением. Частота совместного с ГФРТ переноса того или иного признака в стабильные клоны служит мерой расстояния между генами соответствующих маркеров, и с помощью этого метода получено относительно тонкое генетическое картирование животных клеток (Goss, Harris, 1975).

Сходный метод включает в себя выделение и фракционирование хромосом донорных клеток, сопровождающиеся введением хромосом в фрагментированной форме в мутантные клетки-реципиенты (Willecke et al., 1976a, b). И в этом случае степень

совместного переноса отдельных генов служит мерой расстояния между ними.

Другие системы отбора основаны на слиянии нормальных лимфоцитов человека или клеток асцитных опухолей (плохо растущих in vitro) с дефектными мышиными клетками (опять в среде НАТ) или слиянии нуждающихся в пролине клеток СНО и дефектных мышиных клеток в лишенной пролина среде НАТ.

Клетки человека гибнут в присутствии 10^{-7} М уабаина, а клетки мыши относительно устойчивы к этому агенту, и летальная доза уабаина для мышиных клеток составляет 10^{-3} М. Гибридные клетки мыши и человека обладают промежуточной чувствительностью, в связи с чем среда НАТ, содержащая 10^{-7} М уабаина, может быть использована в качестве селективной для отбора гибридных клеток человека и мышиных клеток ТК$^-$ или ГФРТ$^-$. Это позволяет использовать в опытах по слиянию первичные культуры клеток человека и другие неселектируемые штаммы (Mayhew, 1972; Thompson, Baker, 1973).

13.5.1. Слияние клеток с помощью вируса Сендай

Клетки способны к спонтанному слиянию, но частота слияний резко увеличивается при обработке клеток различными агентами, наиболее распространенным из которых является инактивированный вирус Сендай.

Используются вирусы, инактивированные ультрафиолетовым облучением или обработкой β-пропиолактоном (Neff, Enders, 1968) (см. разд. 14.2.4).

Слияние клеток лучше проводить в суспензии, но можно использовать и клеточные монослои. Действие вируса Сендай трудно контролировать, и процесс слияния клеток в монослое, выйдя из-под контроля, может приводить к образованию поликариот, содержащих до 10 ядер, большинство из которых оказываются нежизнеспособными. Для ограничения этого процесса рекомендуется брать сливаемые клетки в неравных количествах, например 1 : 1000. Монослой смешанных клеток следует проинкубировать в течение 24 ч, и затем, после удаления среды, обработать клетки инактивированным вирусом Сендай при 0—4 °С в течение 10 мин (за это время происходит адсорбция вируса), промыть несколько раз средой, не содержащей сыворотки, и инкубировать далее в ростовой среде при 37 °С. В этих условиях сливается примерно 4% клеток, но точное число слившихся клеток зависит главным образом от типа использованных клеток. При инкубации обработанных вирусом клеток при 37 °С клеточная мембрана, прилежащая к участкам адсорбции вируса, повреждается и образуются цитоплазматические мостики, соединяющие соседние клетки. Этот процесс происходит в тече-

ние 1 мин. По мере репарации поврежденных участков межклеточные мостики уширяются и образуется гигантская клетка (Hosaka, Koshi, 1968). После инкубации при 37 °C в течение часа клетки следует собрать и высеять в новый культуральный сосуд при плотности 10^5 клеток в 1 мл.

Предлагается следующая *стандартная процедура* для слияния клеток инактивированным вирусом Сендай:

— Суспензии двух типов клеток, предназначенных к слиянию, смешать в сосуде с завинчивающейся крышкой. $(5—10)\cdot 10^6$ клеток каждого типа должно присутствовать в общем объеме 1 мл СБСР.

— Равный объем (1 мл) инактивированного вируса Сендай ($4\cdot 10^{10}$ частиц или 1000 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ)/мл) (разд. 14.3.3) добавить к клеточной суспензии и довести pH до 8,0—8,5.

— Легко встряхивать сосуд при 37 °C в течение 30—40 мин. Некоторые авторы рекомендуют предварительно встряхивать суспензию при 0—4 °C в течение 30 мин. Встряхивание суспензии при 37 °C приводит к немедленному слипанию клеток и некоторому снижению pH.

— Перенести 1 мл суспензии в чашку Петри диаметром 5 см и добавить 4 мл полной среды (Watkins, 1971; Stadler, Adelberg, 1972).

13.5.2. Слияние клеток BHK21/C13 с эритроцитами кур с использованием вируса Сендай

Эритроциты птиц имеют ядра, но вирус Сендай, помимо того, что он индуцирует агглютинацию, вызывает также гемолиз, так что в слиянии участвуют тени эритроцитов, имеющие ядра и при этом содержащие мало цитоплазмы.

— Трипсинизировать (разд. 5.2) клетки хомячка и ресуспендировать их в среде Игла с 10% сыворотки теленка. Промыть дважды центрифугированием и ресуспендировать в свежей МСИ без сыворотки (приложение 1) до концентрации $2\cdot 10^6$ клеток в 1 мл.

— Выделить эритроциты из 17-дневного оплодотворенного куриного яйца. Для этого удалить скорлупу над воздушным мешком, разрезать кровеносные сосуды в оболочке и дать крови излиться в аллантоисную жидкость. Удалить жидкость и промыть клетки МСИ без сыворотки (0,5 мл).

— Смешать 0,1 мл суспензии клеток хомячка с 0,1 мл суспензии эритроцитов и 0,1 мл инактивированного вируса Сендай (200 ГАЕ) в 15-миллилитровой стерильной центрифужной пробирке и инкубировать при 37 °C в течение 25 мин.

— Прилить в пробирку МСИ с 10% сыворотки теленка до об-

щего объема 5 мл и перенести суспензию в чашку Петри диаметром 5 см, содержащую покровные стекла. Инкубировать при 37 °С в продуваемом CO_2 термостате.

— Удалить покровные стекла, промыть их дважды в ФСБ-А (приложение 1) и фиксировать в метаноле (10 мин). Окрашивать 3 мин по Мэй-Грюнвальд Гимза (приложение 2), промыть дистиллированной водой и ацетоном и заключить на предметном стекле клетками внутрь.

13.5.3. Слияние клеток с помощью лизолецитина

Трудности, связанные с использованием инактивированного вируса Сендай, привели к развитию других методов слияния клеток. Наиболее простые из этих методов — это методы слияния с помощью лизолецитина и с помощью полиэтиленгликоля.

— Совместно культивировать в течение ночи около $2 \cdot 10^5$ клеток каждого типа в 4 мл среды.

— Удалить среду и дважды промыть пласт клеток 4 мл ацетатного буфера (0,1 M NaCl; 0,05 M ацетата натрия, pH 5,8).

— Добавить 4 мл ацетатного буфера, содержащего лизолецитин (100 мкг/мл).

— Через 15 мин при 37 °С удалить лизолецитин, дважды промыть клеточный пласт полной средой и вернуть клетки в термостат в 4 мл полной среды (Croce et al., 1971; Keay et al., 1972).

13.5.4. Слияние клеток с использованием полиэтиленгликоля

Этот метод, предложенный Понтекорво (Davidson et al., 1976; Pontecorvo et al., 1977), является самым простым и наиболее часто используется.

— Приготовить смешанную суспензию клеток, предназначенных для слияния, и осадить клетки. Этот этап представляет собой наиболее важную часть всей процедуры, но эффективность слияния увеличивается при последующих обработках.

— Ресуспендировать клеточный осадок в 0,5 мл 40—50%-ного полиэтиленгликоля (PEG 1500) в среде, не содержащей сыворотки. Присутствие 15% диметилсульфоксида может увеличить выход гибридных клеток.

— После инкубации при 37 °С в течение 1 мин добавить еще 0,5 мл 20%-ного полиэтиленгликоля в среде без сыворотки.

— После 3-минутной инкубации разбавить суспензию полной средой, промыть клетки переосаждением и высеять их в многолуночную пластинку в селективной среде.

13.6. Межклеточные связи

Ни клетки ТК⁻, ни клетки ГФРТ⁻ не способны расти в отдельности в среде НАТ, но смешанная популяция этих двух мутантных линий может расти в среде НАТ (рис. 13.5).

Эта метаболическая кооперация — отнюдь не результат отбора гибридных клеток, поскольку она обнаруживается сразу после смешивания клеток в отсутствие индуцирующих слияние

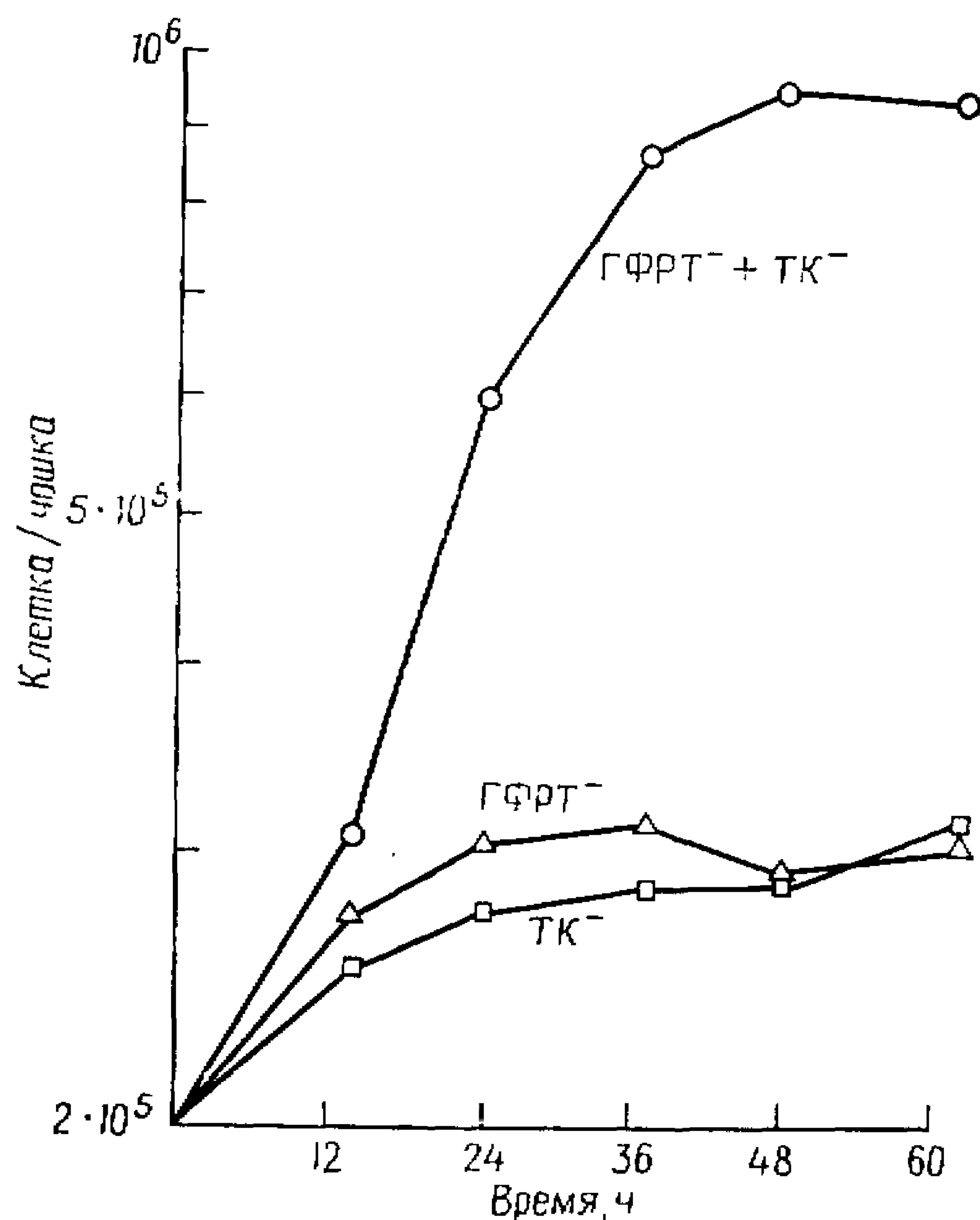


Рис. 13.5. Метаболическая кооперация клеток ВНК21/13. Рост клеток ВНК-ГФРТ⁻ и ВНК-ТК⁻ отдельно и в смешанной (1 : 1) культуре в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ). ГФРТ — гипоксантинфосфорибозилтрансфераза; ТК — тимидинкиназа. [Перепечатано из (Pitts, 1971) с любезного разрешения автора и издателей.]

агентов. Кооперация обусловлена обменом низкомолекулярных соединений через соединяющие клетки щелевые контакты (gap junctions). Благодаря этим контактам клетки ТК⁻ получают тимидилат от соседних клеток ГФРТ⁻, а последние получают в обмен пуриновые нуклеотиды. Другими низкомолекулярными соединениями, проходящими через щелевые контакты, являются тетрагидрофолят (Finbow, Pitts, 1979) и красители различного размера с мол. массой вплоть до 1000 (Pitts, Finbow, 1977; Bennet, 1973); следовательно, соседние клетки могут обмениваться большинством мелких молекул.

Для возникновения межклеточных связей необходимо наличие между клетками контакта. Используя радиоавтографический метод, можно показать, что диффузия нуклеотидов между клетками возможна только при наличии щелевого контакта, а клетки, расположенные на таком же расстоянии, но не имеющие истинного контакта, оказываются несвязанными.

Возникновение межклеточных связей может затруднять отбор гибридов, если только клетки не посеяны с низкой плотностью, что делает образование контактов маловероятным. С другой стороны, гибриды могут быть получены с помощью клеток, которые не способны к образованию связей. Одной из линий клеток, утративших способность к образованию межклеточных связей, является линия клеток L929 и полученная из нее сублиния A9 ГФРТ⁻ (Pitts, 1971).

13.6.1. Подсчет числа зерен и межклеточные связи

Инкубация клеток с тритированными уридином или гипоксантином приводит к включению радиоактивности в РНК во всех клетках, за исключением митотических. Подсчет числа зерен на радиоавтографах показывает, что оно соответствует распределению Пуассона со средней точкой, отвечающей относительной скорости синтеза РНК в культуре. При инкубации клеток ГФРТ⁻ с тритированным гипоксантином над клетками обнаруживается только фоновое количество зерен серебра. Смешанные популяции клеток, часть из которых лишена ГФРТ, легко различаются при посеве с низкой плотностью. Однако при высокой плотности клеток, когда возможны межклеточные коммуникации и ГФРТ-положительные клетки могут передавать радиоактивные нуклеотиды своим мутантным соседям через щелевые контакты, различить клетки оказывается значительно сложнее (Pitts, Simms, 1977). Дифференциация клеток в этих условиях может быть проведена только с помощью компьютерной программы, которая не только выявляет наличие двух типов клеток, но и позволяет вычислить среднее число зерен над клетками каждого типа.

Глава 14

Вирусы

14.1. Введение

Клеточные культуры — наиболее широко используемое и незаменимое средство для получения и культивирования вирусов. Хотя некоторые вирусы проще получать из животных или из куриных эмбрионов, но началом современной эры вирусологии следует считать работу Эндерса и др. (Enders et al., 1949), которые показали, что вирусы полиомы могут размножаться в различных типах культивируемых клеток человека, тогда как их размножение in vivo ограничивается главным образом нейронами серого вещества спинного мозга.

В настоящее время для выделения и размножения вирусов животных используются первичные культуры, штаммы клеток и установившиеся клеточные линии. В общих чертах процедура оказывается одинаковой для всех вирусов: комбинации клеток.

Среду удаляют с клеточного монослоя и монослой промывают СБСР или ФСБ (приложение 1) для удаления ингибиторов (антител), которые могут присутствовать в среде. Вирусные частицы суспендируются в небольшом количестве СБСР или ФСБ и адсорбируются клетками в течение 30—60 мин. После этого солевые растворы заменяются свежей средой.

Заражение вирусами культивируемых клеток вызывает характерные морфологические изменения клеток. Конечные дегенеративные клеточные процессы (цитопатогенный эффект, ЦПЭ) обнаруживаются только через несколько недель роста в присутствии вирусов, но в ряде случаев ЦПЭ обнаруживаются уже через 12 ч. Детали морфологических изменений оказываются различными в случае разных вирусов.

Если вместо продуктивной инфекции вирус вызывает клеточную трансформацию, то это также сопровождается характерными изменениями морфологии и особенностей роста клеток. Более подробно это рассматривается в разд. 14.4.

Для более подробного ознакомления с вирусами животных следует обратиться к соответствующей монографии (Fenner et al., 1974).

14.1.1. Классификация вирусов животных

В классификации, приведенной в табл. 14.1, представлено 16 групп вирусов животных. В основе этой классификации лежат: а) природа нуклеиновых кислот вирусов, б) структурная

симметрия вирусных частиц, в) наличие оболочки и г) размер вирионов. Классификация упрощена по сравнению с классификацией Френкель-Конрата (Fraenkel-Conrat, 1974) и напоминает классификацию Вилди (Wildy, 1971), но отличается от последней в деталях, поскольку точная таксономическая взаимосвязь не рассматривается.

14.1.2. Предосторожности при работе с зараженными вирусами клетками

Вирусы оказывают цитопатогенное действие и служат этиологическими агентами при многих заболеваниях человека и животных. Кроме того, многие вирусы (например, онкорнавирусы, вирус герпеса тип II, аденовирусы, вирус полиомы и SV40) являются, по-видимому, агентами, вызывающими развитие опухолей у животных. Из-за способности вирусов проходить через бактериальные фильтры бывает трудно исключить вирусы из культур незараженных клеток при наличии вирусных суспензий, когда возможна передача вируса через воздух культуральной комнаты.

Указанные ниже меры предосторожности носят самый общий характер и применимы только в тех случаях, когда вирусы не представляют какой-либо особой опасности, т. е. в случае вирусов, не перечисленных в списке Годбера опасных патогенов (Godber, 1975). При использовании особо опасных вирусов следует применять дополнительные меры предосторожности, и исследователь должен обратиться к вышеупомянутому списку Годбера, в котором приведены правила лабораторного использования патогенов категории А, т. е. вирусов, представляющих опасность для здоровья сотрудников лаборатории или людей и животных окружающего мира. Материал, содержащий живые организмы этой категории, не может быть использован в лабораториях Соединенного Королевства без специального разрешения властей. К вирусам, представляющим особую опасность, относятся вирусы ньюкаслской болезни, вирусы ящура, вирусы везикулярного стоматита, вирусы оспы, вирусы бешенства, вирусы герпеса типа В и так далее. Кроме того, нельзя быть уверенным, что даже такие вирусы, как SV40, не представляют опасности для человека, и в монографии, опубликованной лабораториями Колд-Спринг-Харбора (Hellman et al., 1973), рассмотрены различные патологические последствия, которые могут возникать в биологических лабораториях.

— Для заражения клеток и роста зараженных вирусами клеток должна использоваться специальная комната или группа комнат.
— Никакие живые вирусы не должны выноситься из этих помещений, не будучи заключены в плотно закрывающиеся

Таблица 14.1

Классификация вирусов животных[1]

Группа	Нуклеиновая кислота	Средняя мол. масса 10^6	Диаметр вириона, нм	Форма	Симметрия	(±) оболочка	Пример
Парвовирусы	ДНК оц	2	20	Сферическая	Икосаэдр	—	МВМ
Паповавирусы	ДНК дц	3—5	45—55	»	»	—	SV40
Аденовирусы	ДНК дц	20—25	70—80	»	»	—	Ad 2
Герпесвирусы	ДНК дц	54—92	100—150	Примерно сферическая	»	+	ВГП
Вирусы группы оспы	ДНК дц	160—200	300×240×100	Кирпичеобразная	Сложная	+	Вирус осповакцины
Пикорнавирусы	РНК оц	~2	20—30	Сферическая	Икосаэдр	—	Полиовирус
Тога- или энцефаловирусы	РНК оц	2—3	50—70	»	Куб	+	Вирус Синдбис
(Орто)миксовирусы	РНК оц	~3	80—120	Примерно сферическая	Спираль	+	Вирус гриппа
Коронавирусы	РНК оц	~3	80—120	То же	»	+	Вирус мышиного гепатита
Парамиксовирусы	РНК оц	7,5	100—300	Плейоморфная	Спираль	+	ВНБ
Рабдовирусы	РНК оц	6	175×75	Пулевидная	»	+	ВВС
Аренавирусы	РНК оц		85—120	Примерно сферическая	»	+	Вирус Ласса
Лейковирусы (онкорна или ретро)	РНК оц РНК оц	10—12	100—120	То же	Сложная	+	ВСР
Реовирусы	РНК дц	10	70—90	Сферическая	Икосаэдр	—	Реовирус

[1] Данная классификация предложена Френкель-Конратом (Fraenkel-Conrat, 1974). «оц» и «дц» обозначают соответственно одноцепочечную и двухцепочечную нуклеиновые кислоты. (±) обозначает наличие или отсутствие оболочки вируса. Сокращенные обозначения вирусов приведены в приложении 6.

контейнеры. Следует принимать меры предосторожности, чтобы наружные поверхности этих контейнеров не были загрязнены вирусными частицами.

— При работе с вирусами должны быть использованы специальные защитные одежды (лабораторные халаты). После работы эта одежда должна помещаться в специальный бак для автоклавирования (Sterilin Ltd.; приложение 3).
— Все среды и стеклянная посуда, которые были в контакте с вирусами, должны быть обработаны хлоросом (разд. 4.1.1); только после этого их можно выносить из помещения, предназначенного для работы с вирусами.
— Вся пластиковая посуда должна быть помещена в специальный бак для автоклавирования (Sterilin Ltd., приложение 3).
— Оборудование для хранения и обработки вирусного материала должно размещаться внутри помещения для работы с вирусами.
— Лаборатория должна быть оснащена двухцикловыми автоклавами, чтобы сотрудники лаборатории были защищены от вредоносных материалов.

14.2. Получение вирусов

Для изучения кривой роста вирусов проводится одноэтапный цикл роста. Применяется высокая множественность заражения (МЖ), чтобы быть уверенным в заражении всех клеток. Обычно бывает достаточным применять 10 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку. Для получения вирусов фазу инфицирования удлиняют в условиях, обеспечивающих вторичное заражение; в этом случае рекомендуется низкая МЖ, особенно когда имеет место тенденция к образованию дефектных вирусных частиц.

14.2.1. Процедура получения вируса герпеса простого, вируса псевдобешенства или вируса энцефаломиокардита

— В 12 вращающихся бутылей Винчестер посеять по $2 \cdot 10^7$ клеток BHKC13 в МСИТС (минимальная среда Игла с 10% триптозофосфатного бульона и 10% сыворотки теленка) и выращивать при 37 °С в течение 3 дней.
— Инфицировать каждую культуру вирусом (20 мл) в среде Игла, не содержащей сыворотки при множественности заражения 1 БОЕ на 300 клеток.
— Инкубировать при 37 °С в течение 1 ч для адсорбции вируса клетками. Добавить 50 мл среды Игла с 5% триптозофосфата и 5% сыворотки теленка и инкубировать при 37 °С

в течение 2 дней или при 32 °C в течение 3 дней (для вируса герпеса простого), в течение 27—36 ч (для вируса псевдобешенства) и в течение 24 ч (для вируса энцефаломиокардита). При подкислении среды следует через сутки добавить бикарбонат.

— Встряхивая сосуды, отделить клетки от стекла. Если клетки не отделяются, обработать монослой версеном, но НЕ трипсином.

— Осадить клетки центрифугированием при 400g в течение 10 мин.

— Слить надосадочную фракцию и центрифугировать ее при 20 000g (100 000g в случае вируса энцефаломиокардита) в течение 90 мин. Полученную надосадочную фракцию слить в раствор хлороса, а осадок суспендировать в МСИ с 10% триптозофосфата и 5% сыворотки теленка (приложение 1) (2 мл на бутыль). Аликвоты суспензии разлить по маленьким бутылям и хранить при —70 °C (ВИРУС, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НАДОСАДОЧНОЙ ФРАКЦИЕЙ).

— Образовавшие осадок клетки разрушить озвучиванием или тремя циклами замораживания и оттаивания в бане лед/этанол. Осадить обломки клеток при 400g в течение 10 мин и аликвоты надосадочной фракции хранить при —70 °C (ВИРУС, АССОЦИИРОВАННЫЙ С КЛЕТКАМИ).

— Оба препарата вирусов проверить на бактериальное загрязнение (гл. 9), инокулируя препараты в бульон с экстрактом сердца и мозга (1 неделя при 37 °C) или в жидкую среду Саборада (1 неделя при 37 °C) (приложение 4). Вирусы из хранящихся препаратов можно очищать седиментацией в растворах с высокой плотностью, например в насыщенных растворах KBr или RbCl (Black et al., 1964). В этих условиях выявляются полосы, соответствующие вирионам и пустым частицам.

14.2.2. Процедура для получения вируса SV40

а. В 20—30 чашках диаметром 9 см высеять по $2 \cdot 10^6$ клеток BSCl в среде МСИС (среда Игла с 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота).

б. После 1—2 дней роста заразить клетки вирусом с множественностью заражения 0,01 БОЕ на клетку. Предпочтительно использовать вирус, выделенный из бляшек (см. разд. 14.3.1), чтобы избежать примесей дефектных вирионов.

в. После роста в течение недели — 10 дней (т. е. когда в большинстве клеток проявляется сильный цитопатический эффект) соскрести клетки в среду. Выдержать клетки при 4 °C в течение 1 ч и затем центрифугировать при 15 000g в течение 30 мин.

г. Ресуспендировать клетки в 20 мл ФСБ-А и добавить панкреатическую ДНК-азу I (40 мкг/мл) и панкреатическую РНК-азу (12 мкг/мл).

д. Разрушить клетки тремя циклами замораживания — оттаивания или озвучиванием и инкубировать 30 мин при 37 °С.

е. Добавить дезоксихолат до концентрации 0,15% и выдержать при комнатной температуре в течение 90 мин. Центрифугировать при 15 000g в течение 30 мин при 20 °С.

ж. Перенести надосадочную фракцию в пробирки ротора SW27 центрифуги Спинко, в которые предварительно внесено по 10 мл насыщенного раствора KBr в ФСБ-А. Центрифугировать при 23 000 об/мин в течение 3 ч при 20 °С. После этого в растворе KBr обнаруживаются две полосы: нижняя, содержащая вирионы, и верхняя, содержащая пустые частицы.

з. Проколов пробирки, собрать полосы с вирионами и диализовать их против ФСБ-А (2 раза по 1 часу).

и. Добавить твердый CsCl до плотности 1,34 г/мл и центрифугировать аликвоты по 3 мл, покрытые сверху слоем парафинового масла в роторе Спинко SW50.1 при 40 000 об/мин и 20 °С в течение 18 ч. Вирионы оказываются в зоне частиц с плавучей плотностью 1,34 г/мл.

к. Собирать фракции, оценивая плавучую плотность (по индексу преломления) и поглощение ультрафиолетового света при 260 и 280 нм для выявления вирионов и пустых частиц (последние характеризуются относительно низким поглощением при 260 нм).

л. Объединить фракции, содержащие вирионы, и диализировать против ФСБ при 4 °С в течение 2 ч.

м. Стерилизовать пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, если вирусы нужны для последующей инфекции.

Хотя эта процедура необходима для получения препаратов чистых вирионов, она, как правило, не используется при получении инфекционных вирусов. В последнем случае клетки собираются асептически и обрабатываются вплоть до этапа «д», но без использования ДНК-азы и РНК-азы. Клеточные обломки удаляются центрифугированием при 15 000g в течение 30 мин, а надосадочную фракцию используют в качестве источника вируса. Эта надосадочная фракция должна быть тестирована на бактериальное загрязнение в бульоне с экстрактом сердца и мозга и в жидкой среде Сабoрада (приложение 4). Вирус должен храниться при —70 °С в концентрации 10^{10} БОЕ/мл.

14.2.3. Одноэтапный рост SV40

Этот процесс можно изучать в чашках диаметром 9 см или в лунках пластинок для культуры тканей.

— Высеять $2 \cdot 10^6$ клеток (чашки диаметром 9 см) или 10^5 кле-

ток (лунки пластинок для культуры тканей) соответственно в 10 мл или 0,5 мл среды Игла, содержащей заменимые аминокислоты, пенициллин со стрептомицином и 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота (приложение 1).

— Через 1—2 дня роста сменить среду и добавить SV40 со множественностью заражения 1 БОЕ/клетка (2 мл на чашку или 0,1 мл на лунку.).

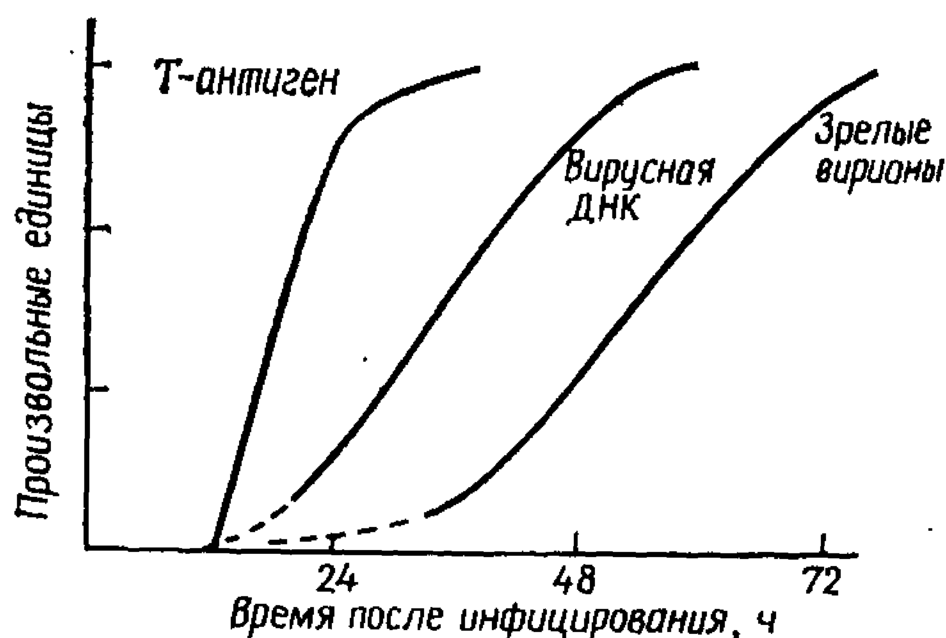


Рис. 14.1. Динамика инфицирования вирусом SV40. Клетки обезьяны в монослойной культуре заражали вирусом SV40 при множественности 1—10 БОЕ на клетку. Т-антиген может быть обнаружен с помощью иммунофлуоресценции, синтез вирусной ДНК — по включению ^{3}H-тимидина с последующим отделением вирусной ДНК (путем экстракции по Херту и центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы или электрофореза в агарозе в присутствии додецилсульфата натрия). Зрелые вирионы выявляли по инфекционности с использованием теста на бляшки. [Данные из (Tooze, 1973; Girard et al., 1975; Basilico, Zouzias, 1976).]

— Инкубировать при 37 °С в течение 60—90 мин для адсорбции вируса клетками и добавить среду Игла, содержащую 5% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (8 мл на чашку и 0,4 мл на лунку).

Синтез ДНК достигает максимума на 2-й день после заражения. Он может быть обнаружен и на первый день; ему соответствует или слегка предшествует образование Т-антигена. Зрелые вирионы обнаруживаются после короткого лаг-периода (рис. 14.1).

14.2.4. Вирус Сендай — получение и инактивация

14.2.4.1. Получение

Вирус Сендай выращивается в аллантоисной полости куриных яиц. Метод выращивания описан Харрисом и Уоткинсом (Harris, Watkins, 1965).

— Получить зараженную аллантоисную жидкость, содержащую

вирус Сендай в концентрации 8000 ГАЕ/мл и развести ее ФСБ в соотношении 1 : 10^4.
— Инъецировать 0,1 мл в аллантоисную полость куриных яиц на 10—11-й день после оплодотворения.
— Инкубировать в течение 3 суток при 37 °С и затем в течение ночи при 4 °С.
— Собрать аллантоисную жидкость и центрифугировать при 400 g в течение 10 мин.
— Определить титр гемагглютинации (разд. 14.3.3).
— Центрифугировать при 30 000g в течение 30 мин и суспендировать осадок в 1/10 исходного объема СБСР Хэнкса.
— Хранить при —70 °С.

14.2.4.2. Инактивация ультрафиолетом

— Поместить 1 мл концентрированной суспензии вирусов в часовое стекло и выдержать 3 мин под УФ-светом от гермицидной лампы 15 Вт (мощность дозы облучения 3000 эрг/см^2/ /сек). Перемешивать суспензию через 1 и 2 мин облучения.

14.2.4.3. Инактивация β-пропиолактоном (Neff, Enders, 1968)

— Приготовить 10%-ный водный раствор β-пропиолактона непосредственно перед использованием.
— Разбавить до 1,3% изотоническим солевым раствором, содержащим 1,68% $NaHCO_3$.
— Добавить 1 часть разведенного раствора β-пропиолактона к 9 частям суспензии вируса Сендай (титр гемагглютинации между 1 : 2000 и 1 : 10 000) (разд. 14.3.3).
— Встряхивать в тщательно закупоренном контейнере при 4 °С, в течение 10 мин и затем выдержать при 37 °С в течение 2 ч, встряхивая каждые 10 мин.
— Хранить в течение ночи при 4 °С для обеспечения полного гидролиза β-пропиолактона.
— Инактивированный вирус можно сохранять в присутствии 0,5%-ного сывороточного альбумина при —65 °С в течение 5 недель.

14.3. Обнаружение вирусов

Можно обнаружить присутствие вирусов, а иногда и определить их количество с помощью целого ряда различных тестов, как, например:

а) индукция характерных изменений в клетках, которые могут быть использованы в анализе на бляшки (см. ниже);
б) образование зараженными клетками вирусных частиц, которые могут быть идентифицированы с помощью классифи-

кации, предложенной в табл. 14.1, — например, по природе нуклеиновых кислот и симметрии частиц;

в) образование зараженными клетками нуклеиновых кислот, которые могут обладать характерной плотностью при центрифугировании в градиенте плотности или характерным размером при электрофорезе в агарозном геле или центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы (Kaplan, 1969; Tegtmeyer, 1972);

г) образование зараженными клетками или трансформированными клетками характерных антигенов, которые могут быть визуализованы с помощью окрашивания флуоресцирующими специфическими антителами либо вызывать изменения в клеточной мембране, приводящие к адсорбции гема (Deibel, Hotchin, 1961);

д) наличие антигенов на вирусных частицах может приводить к реакциям гемагглютинации, позволяющим проводить количественную оценку (разд. 14.3.3);

е) образование зараженными клетками характерных ферментов, или ферментов, легко отличаемых по свойствам от соответствующих ферментов клеток-хозяев (Keir et al., 1966; Baltimore, Smoler, 1971; Harada et al., 1975).

Ниже приведено описание некоторых тестов. Поскольку выбор возможных вирусов и тестов бесконечен, то автор остановился только на тех, с которыми он наиболее знаком.

14.3.1. Метод подсчета бляшек

В основе метода лежит заражение небольшого числа клеток в полном монослое. Вирус, образующийся в зараженных клетках, распространяется вертикально, заражая соседние клетки; известны различные способы предотвращения дальнейшего распространения вируса. Дегенеративный эффект вирусов на клетки распространяется до тех пор, пока не обнаруживается видимая область погибших клеток (бляшка). Окрашивание клеточного пласта позволяет легко визуализировать бесцветные бляшки.

Обычно клеточные культуры заражают препаратами вируса в различном разведении, покрывающем диапазон 10^4. Поэтому сток вирусов разводится в 10-кратном объеме.

14.3.1.1. Разведение вирусов

Приготовить серию пробирок, содержащих по 0,9 мл СБСР или ФСБ или среды Игла без сыворотки, и в первую пробирку внести 0,1 мл суспензии вирусных частиц из стока. Перемешать содержимое пробирки и 0,1 мл перенести в следующую пробир-

ку и так далее. Исходная суспензия должна содержать 200—400 инфекционных единиц в 1 мл, а тестируются обычно разведения в диапазоне 10^{-5}—10^{-9}.

14.3.1.2. Суспензионный тест

Вирусы герпеса и псевдобешенства могут заражать клетки ВНКС13 в суспензии.

а. Приготовить клеточную суспензию, содержащую $3 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл.
б. Добавить по 4 мл клеточной суспензии в каждый из 5 универсальных флаконов.
в. Добавить по 0,8 мл суспензий вирусов в различном разведении в каждый флакон.
г. Перемешать на медленной механической мешалке при 37 °С в течение 20 мин.
д. Через 20 мин добавить в каждый флакон по 12 мл среды Игла с 10% триптозофосфатного бульона и 10% сыворотки теленка (для вируса псевдобешенства) или среды Игла с 10% триптозофосфата и 5% сыворотки человека (для вируса герпеса).
е. Перемешать и посеять по 4 мл в чашки Петри диаметром 5 мм.
ж. Инкубировать в продуваемом CO_2 термостате при 37 °С. Через 2 ч добавить в культуры с вирусом псевдобешенства по 25 мкл раствора гепарина 10 мг/мл.
з. Через 24 ч (вирус псевдобешенства) или 48 ч (вирус герпеса) слить среду из чашек в раствор хлороса.
и. Фиксировать зараженный монослой 10%-ным формолом в физиологическом растворе в течение 10—20 мин.
к. Удалить фиксирующий раствор и окрасить по Гимза в течение 10—20 мин.
л. Осторожно отмыть избыток красителя проточной водой и подсчитать число бляшек, используя микроскоп с малым увеличением.

14.3.1.3. Тест в монослое

Для вирусов герпеса и псевдобешенства этот тест аналогичен суспензионному тесту, но заражение происходит в полном монослое (рис. 14.2).

— Посеять в 20 чашек (диаметр 50 мм) по $3 \cdot 10^6$ клеток ВНКС13. Выращивать при 37 °С в течение 24 ч.
— Удалить среду и внести по 0,2 мл каждого разведения вируса в каждую из 4 чашек (включая контрольные чашки, в которые вносится по 0,2 мл СБСР).
— Дать вирусу адсорбироваться в течение 1 ч при 37 °С, ис-

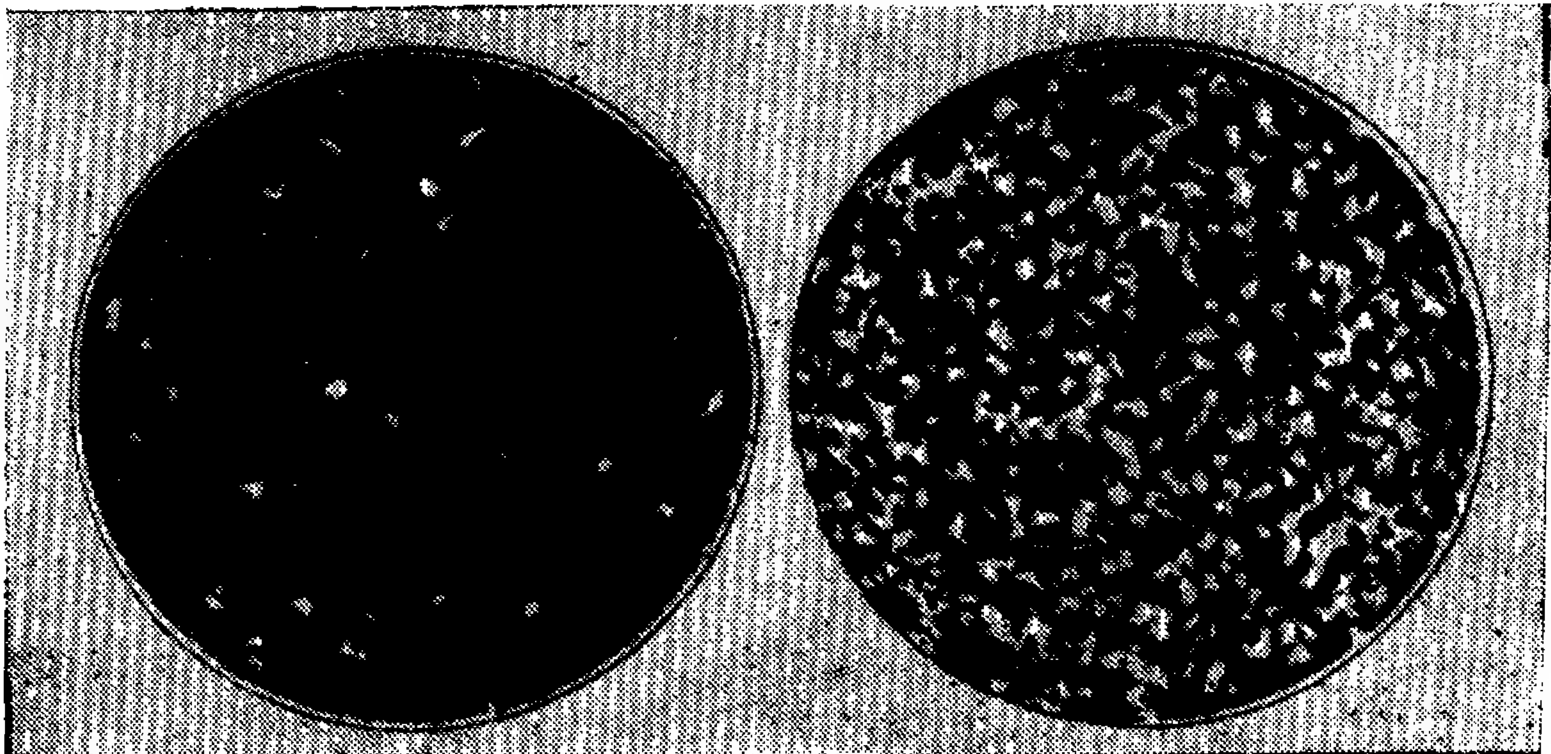


Рис. 14.2. Бляшки вируса простого герпеса на слое клеток ВНК/С13. Полный монослой клеток ВНК21/С13 заражали препаратами вируса простого герпеса (тип 2) в различном разведении. Слева — количество бляшек невелико, но в правой чаше бляшек много.

пользуя продуваемый CO_2 термостат. Время от времени покачивать чашки для равномерного распределения вирусных частиц над поверхностью.

— Через 1 ч добавить по 5 мл среды Игла с 10% триптозофосфатного бульона и 10% сыворотки теленка (для вируса псевдобешенства) или 5% сыворотки человека (для вируса герпеса) и вернуть чашки в термостат.

— Через 2 ч добавить гепарин в культуры, зараженные вирусом псевдобешенства.

— Дальнейшая обработка, как в случае суспензионного теста (этапы «з» — «л»).

14.3.1.4. Тест с наслаиванием агара

— В 20 чашек диаметром 50 мм посеять по $2 \cdot 10^6$—$4 \cdot 10^6$ клеток ВНК21/С3 для вируса энцефаломиокардита или клеток BSC1 для вируса SV40 и выращивать 24 ч при 37 °С до получения полного монослоя.

— Удалить среду и внести по 0,2 мл вирусной суспензии каждого разведения в каждые 4 чашки (в контрольные чашки внести по 0,2 мл СБСР).

— Дать вирусам адсорбироваться в течение 1 ч при 37 °С в продуваемом CO_2 термостате. Время от времени покачивать чашки для равномерного распределения вирусных частиц над монослоем.

— После адсорбции на каждый монослой клеток наслоить по

5 мл агаровой среды, приготавливаемой следующим образом:

Смешать МСИ[1]	75 мл
Агар Noble 2,5%	25 мл (46 °С; см. ниже)
Сыворотка теленка для вируса энцефаломиокардита или сыворотка эмбриона крупного рогатого скота для вируса SV40	5 мл
ДЭАЭ-декстран (0,5%)	1 мл

и уравновесить смесь при 46 °С. Важно поддерживать температуру смеси между 45 и 50 °С. Агар застывает вскоре после нанесения на клетки при 37 °С.

— Инкубировать при 37 °С в течение 24 ч (вирус энцефаломиокардита) или 6 дней (вирус SV40).

— Добавить в каждую чашку по 2 мл покрывающей среды с нейтральным красным (см. ниже) и дать ей затвердеть в полной темноте.

— Вернуть в термостат на 2—3 ч (или даже на несколько дней, если бляшки слишком малы для подсчета).

— Выявить образующиеся бляшки и подсчитать их количество с помощью микроскопа с низким увеличением или с помощью счетчика колоний.

Для приготовления 2,5%-ного агара Noble (Difco Labs.) добавить 25 г агарового порошка в 500 мл дистиллированной воды и довести объем до 1 л. Поместить сосуд в кастрюлю с кипящей водой до полного растворения агара. Разлить по 25 мл в универсальные флаконы с металлическими крышками и автоклавировать при давлении 1 атм в течение 15 мин. Хранить при комнатной температуре.

Для приготовления покрывающей среды с нейтральным красным растворить нейтральный красный до концентрации 0,4% в дистиллированной воде (в случае необходимости с нагреванием) и профильтровать через бумажный фильтр Грина № 9041/2 (приложение 3). Разлить в бутыли по 20 мл и стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин. Хранить при комнатной температуре. Для получения покрывающей среды добавить 2,5 мл раствора красителя к 75 мл среды Игла×1,3 и 25 мл 2,5%-ного агара.

[1] МСИ должна быть взята в концентрации, в 1,3 раза превышающей нормальную (среда Игла×1,3).

14.3.2. Метод флуоресцирующих антител

В прямом методе антитела, полученные к вирусным антигенам, сочетаются с флуорохромом и используются для окраски зараженных клеток. Положительная реакция (желто-зеленый цвет в люминесцентном микроскопе) указывает на присутствие в клетках вирусных антигенов. Этот метод, следовательно, может быть использован для выявления клеточной трансформации, когда антитела вырабатываются, например, против ранних антигенов вируса SV40, или для выявления образования зрелых вирусов, когда получаются антитела против капсидных белков.

В непрямом методе антитела не сочетаются с флуорохромом. Вместо этого после взаимодействия антител с антигенами в фиксированных препаратах клеток к ним добавляются анти-гамма-глобулиновые антитела, конъюгированные с флуорохромом. Этот метод более чувствителен и позволяет избежать конъюгации каждого индивидуального антитела с флуоресцентным красителем. Так, одни и те же флуоресцентные антитела к антителам кролика (полученные у овец против кроличьих гамма-глобулинов) могут быть использованы для окраски любых антител, образующихся у кроликов и взаимодействующих с вирусными антигенами в продуктивно зараженных или трансформированных клетках.

Еще более непрямой, но значительно более чувствительный метод, не требующий использования флуоресцентного микроскопа, был предложен Стернбергером (Sternberger et al., 1970) и известен под названием пероксидазный — антипероксидазный метод. Согласно этому методу, кроличьи антитела взаимодействуют с антигенами фиксированных клеток и затем покрываются антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с комплексами пероксидазы хрена и кроличьей антипероксидазы. После этого препараты обрабатывают диаминобензидином и перекисью водорода; коричневая окраска указывает на присутствие антигенов.

Применимость различных систем рассматривается в работе Тэйлора (Taylor, 1978), в которой можно найти детали иммунопероксидазного метода.

14.3.2.1. Получение антисыворотки

Инъекция животных клеток или клеточных экстрактов вызывает образование антител. Более подробно этот метод рассматривается в монографии Клаузена (Clausen, 1969), принадлежащей к той же серии, что и настоящее издание. К животным, используемым обычно для получения антисывороток, относятся кролики, мыши, хомячки и т. д. Антисыворотку к вирусным ан-

тигенам лучше получать от сингенных хозяев (т. е. от хозяев с тем же генотипом, что и клетки, в которых вирус рос in vitro). Так, инъекция сирийским хомячкам клеток SV28 (трансформированные SV40 клетки BHK21/C13) приводит к образованию опухолей и накоплению антител к Т-антигену в сыворотке животных.

14.3.2.2. Получение глобулиновой фракции

Обычно используется грубое фракционирование антисыворотки, приводящее к удалению альбумина. К сыворотке при 4 °С медленно добавляют равный объем насыщенного холодного раствора сульфата аммония (рН доводят до 7 с помощью аммиака) и смесь далее перемешивают в течение 30 мин либо сыворотку диализуют при 4 °С в течение ночи против 50 объемов сульфата аммония при 50%-ном насыщении.

Осаждаемый сульфатом аммония белок собирают центрифугированием (1200 g в течение 20 мин при 4 °С), растворяют в ФСБ-А и три раза диализуют против 50-кратного объема ФСБ-А для удаления сульфата аммония. Подробности очистки и характеристики сывороток приведены в вышеупомянутой монографии Клаузена (Clausen, 1969).

Антисыворотка к гамма-глобулинам различных животных может быть получена таким же образом, но можно пользоваться препаратами из коммерческих источников, например Flow Laboratories (приложение 3).

14.3.2.3. Конъюгация антисыворотки с флуоресцеином или родамином

Это два распространенных флуорохрома, и для ковалентного связывания с белками используются их активированные формы, например изотиоцианаты. Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и тетраметилродаминизотиоцианат (ТРИТЦ) поставляются фирмами, например Sigma Chemical Co. (приложение 3).

Реакция получается более воспроизводимой, если использовать изотиоцианаты, адсорбированные на целите. Комплексы ФИТЦ-целит также поставляются Sigma Chemical Co., но могут быть приготовлены самими исследователями:

а) растворить 25 мг ФИТЦ в 25 мл ацетона;
б) добавить 500 мг целита и перемешивать несколько минут при комнатной температуре;
в) удалить ацетон под вакуумом и хранить в сухом виде в эксикаторе.

— Смешать 0,5 мл глобулиновой фракции с равным объемом карбонат-бикарбонатного буфера рН 9,3 (4,4 мл 5,3%-ного карбоната натрия и 100 мл 4,2%-ного бикарбоната натрия).

Добавить 15 мг ФИТЦ-целита и плотно закупорить, чтобы избежать потери CO_2. Осторожно помешивать в течение 30 мин при комнатной температуре.

— Удалить целит центрифугированием (800 g, 10 мин) и отделить конъюгированный белок от избытка красителя на колонке с сефадексом G-25 (1×10 см), проводя элюцию ФСБ-А.

Антисыворотки и конъюгированные антисыворотки могут храниться при —20 или 4 °С в присутствии мертиолата (1 часть на 10 000 частей), который действует как консервант.

14.3.2.4. Техника окрашивания

Прямой метод

а. Вырастить клетки на покровных стеклах и заразить вирусом (например, SV40).

б. Удалить покровные стекла из зараженных и контрольных культур и, удерживая их корнцангом или поместив в микродержатель для покровных стекол, окунуть в две смены ФСБ-А при комнатной температуре и высушить двумя сменами ацетона при 0 °С. Высушить стекла на воздухе на фильтровальной бумаге клетками наверх. Принять меры для идентификации индивидуальных покровных стекол по их положению.

в. Поместить покровные стекла в чашки диаметром 5 см, содержащие влажную фильтровальную бумагу. Часто применяется установка стекол на маленькие резиновые пробки.

г. Покрыть каждое стекло двумя каплями конъюгированной с ФИТЦ антисыворотки хомячка к Т-антигену вируса SV40 (разд. 14.3.2). Накрыть чашку крышкой и оставить при комнатной температуре на 45 мин.

д. Промыть покровные стекла тремя сменами ФСБ-А и смонтировать на предметном стекле клетками вниз, используя глицерин в качестве заключающей среды.

Непрямой метод

Повторить этапы «а» — «г» описанного выше прямого метода.

г′. Покрыть каждое покровное стекло двумя каплями неконъюгированной антисыворотки хомячка к Т-антигену вируса SV40 (разд. 14.3.2). Накрыть чашки крышками и оставить на 30—45 мин при комнатной температуре.

д′. Промыть покровные стекла тремя сменами ФСБ-А и высушить в течение 10 мин при комнатной температуре. Поместить в новые чашки.

е′. Покрыть каждое покровное стекло двумя каплями конъюги-

рованной с ФИТЦ антисыворотки козы к иммуноглобулинам хомячка. Закрыть крышкой и оставить на 30 мин при комнатной температуре.

ж'. Промыть покровные стекла тремя сменами ФСБ-А и смонтировать в глицерине на предметном стекле клетками вниз. Исследовать препараты во флуоресцентном микроскопе.

14.3.3. Гемагглютинация

У многих вирусов имеются антигены, которые могут адсорбироваться на эритроцитах и вызывать их слипание. При взаимодействии большого количества вирусных частиц и эритроцитов образуется сеть клеток, и суспензия агглютинирует, т. е. эритроциты выпадают в осадок. Существует некоторая специфичность, заключающаяся в том, что определенные вирусы вызывают агглютинацию эритроцитов определенных животных, но если обнаружена активная комбинация, то гемагглютинация становится быстрым тестом, позволяющим определить титр вируса.

Кровь отбирают в гепаринизированный шприц и эритроциты промывают трехразовым переосаждением в 0,85%-ном NaCl при 200 g в течение 10 мин. Окончательный осадок эритроцитов суспендируют в 200-кратном объеме 0,85%-ного раствора NaCl.

Удобнее всего проводить тест на гемагглютинацию в микротитровальных пластинках (рис. 3.2); разнесение аликвот может проводиться вручную или с помощью автоматического оборудования, поставляемого Titertek (Flow Lab. Ltd.) (приложение 3).

В серию лунок микротитровальной пластинки вносят по 25 мкл 0,85%-ного NaCl или ФСБ; в первую лунку вносят 25 мкл суспензии вируса, и смесь перемешивают (разведение 1 : 2). 25 мкл переносят затем из первой лунки во вторую (разведение 1 : 4) и так далее, до конечного разведения 1 : 2048. После этого в каждую лунку добавляют по 25 мкл суспензии эритроцитов, смесь перемешивают и оставляют при 4 °С, комнатной температуре или 37 °С до наступления гемагглютинации (1—2 ч).

В лунках, где произошла агглютинация, осадок эритроцитов имеет неправильную форму, а в лунках, где гемагглютинации не было, клеточный осадок образует компактную точку на дне лунки. Разведение в последней лунке, в которой происходила гемагглютинация, рассматривается как титр, и этому разведению приписывается значение 1 гемагглютинирующей единицы (ГАЕ). Предшествующее разведение содержит соответственно 2 ГАЕ и так далее.

14.4 Трансформация клеток вирусом

Проникновение вируса в клетку может сопровождаться не продуктивной инфекцией, а трансформацией клеток. Для того чтобы это случилось, весь геном или часть вирусного генома должны встроиться в клеточные хромосомы. Сайт хромосомы, в котором происходит интеграция, не является уникальным, и часто в одной и той же клетке интегрируется несколько копий вирусной ДНК.

У клеток, трансформированных вирусом SV40 или вирусом полиомы, отмечены следующие особенности (Tooze, 1973):

Рост: высокая или недостигаемая плотность насыщения,
пониженная потребность в сыворотке,
способность к росту в агаре или метилцеллюлозе (приложение 6), потеря чувствительности к контактному торможению движения,
образование опухолей при инъекции чувствительным животным,
неориентированный рост,
рост на монослое нормальных клеток.

Поверхность: увеличение способности к агглютинации растительными лектинами,
выявление плодных антигенов,
потери плотных контактов,
наличие трансплантационного антигена.

Присутствие вируса: присутствие вирус-специфических антигенов,
выявление последовательностей вирусной ДНК,
присутствие вирусных мРНК,
возможность в некоторых случаях «спасения» вируса.

14.4.1. Методы трансформации

Известны по крайней мере 4 метода трансформации клеток вирусами.

А. Простейший метод предложили Макферсон и Монтегнир (Macpherson, Montagnier, 1964). Клетки в суспензии заражают вирусом и высеивают в 0,33%-ный агар или 1,2%-ный Methocel (приложение 6), где трансформированные клетки образуют большие колонии, а нетрансформированные — не растут.

Приготовить базальный слой из 7 мл среды (среда Игла в модификации Глазго с триптозофосфатом и сывороткой теленка) с 0,5% бактоагара Difco в чашках диаметром 6 см.

Инкубировать суспензию клеток с вирусом в течение 1 ч и добавить (10^3—5)·10^5 клеток в 1,5 мл среды, содержащей 0,3% агара или 1,2% карбоксиметилцеллюлозы (Stoker, 1968), поверх базального слоя.

Инкубировать 7—10 дней при 37 °С в продуваемом CO_2 термостате; в этих условиях только трансформированные клетки образуют колонии.

Б. Культуру клеток, не достигшую полного монослоя, заразить вирусом и выращивать клетки в течение 2—3 недель, пока на монослое нетрансформированных клеток не вырастут плотные колонии трансформированных клеток.

В. Зараженные вирусами клетки посеять при низкой плотности и низкой концентрации сыворотки. Многие клетки в этих условиях делятся один или два раза (абортивная инфекция), но лишь стабильно трансформированные клетки могут образовывать колонии в отсутствие сывороточных факторов (Smith et al., 1970).

Г. Три первых метода осуществляют отбор трансформированных клеток по тому или иному новому свойству из перечисленных выше. Стокер и Макферсон (Stoker, Macpherson, 1961) заражали вирусом полный монослой и затем высевали клетки при низкой плотности. Затем они отбирали колонии трансформированных клеток по внешним признакам в отсутствие какого-либо давления отбора.

Глава 15

Дифференцировка в культурах клеток

Изучение процессов дифференцировки у многоклеточных организмов связано со множеством проблем, возникающих из-за сложного и мало понятного взаимодействия различных тканей. Эти взаимодействия могут быть ограничены или устранены при работе с культурами клеток. Ниже приведено описание нескольких систем, изучение которых может пролить свет на механизм дифференцировки клеток и тканей.

15.1. Эритроидная дифференцировка клеток Френд

Процессы эритропоэза рассмотрены в работах Гаррисона (Harrison, 1976, 1977) и Оркина (Orkin, 1978). Эритроидные клетки, так же как и другие клетки крови, образуются из общих гематопоэтических стволовых клеток. После установления компетентности к эритроидной дифференцировке стволовые клетки пролиферируют в течение нескольких генераций, становясь чувствительными к гормону эритропоэтину, который стимулирует пролиферацию компетентных эритроидных стволовых клеток и проэритробластов, дифференцирующихся затем в зрелые эритроидные клетки, содержащие гемоглобин.

Изучение процесса дифференцировки в нормальных эритроидных системах тормозится трудностями, связанными с получением достаточного количества эритроидных клеток на определенной стадии развития.

Клетки Френд представляют собой клетки мышиного, индуцированного вирусом эритролейкоза, которые растут в суспензионной культуре и характеризуются ограниченной степенью дифференцировки в ряду эритроидных клеток (Friend et al., 1966; Patuleia, Friend, 1967). Клетками-мишенями для вируса Френд являются, по-видимому, поздние компетентные стволовые клетки. При нормальных условиях роста только 1—2% клеток окрашиваются бензидином (гемоглобин-положительные). Эти клетки, очевидно, задерживаются на стадии проэритробластов и не чувствительны к эритропоэтину. Однако в ответ на обработку диметилсульфоксидом (2%) содержание бензидин-

положительных клеток увеличивается после 3-дневного лаг-периода и к 5-му дню достигает 96% (Friend et al., 1971), т. е. клетки претерпевают серию изменений, характерных для дифференцировки нормальных эритроидных клеток.

В опубликованном несколько лет назад обзоре (Marks, Rifkind, 1978) рассматриваются особенности индуцированной дифференцировки и перечислено большое количество индукторов (масляная кислота, гемин, уабаин), которые могут быть использованы вместо диметилсульфоксида. Однако не все эти индукторы вызывают те же самые эффекты во всех клонах, и некоторые резистентные к диметилсульфоксиду варианты обладают различными фенотипами (Harrison et al., 1978).

Клетки Френд, следовательно, могут использоваться в качестве идеальной системы in vitro для изучения дифференцировки, и было показано, что обработка диметилсульфоксидом приводит к прекращению клеточных делений и образованию глобиновых мРНК (Harrison, 1976; Minty et al., 1978). Индукция глобиновых мРНК специфически блокируется гидрокортизоном (Scher et al., 1978) и зависит от некоторых событий, происходящих в фазе G1 синхронизированных клеток (Gampari et al., 1978). Однако вопрос о том, имеет ли существенное значение для дифференцировки синтез ДНК, остается открытым (Harrison, 1976).

В отсутствие индуктора клетки Френд продолжают нормально делиться, но в присутствии диметилсульфоксида жизнеспособность клеток значительно снижается, хотя количество клеток может увеличиваться в 10 раз.

15.1.1. Индукция синтеза глобина в клетках Френд

В чашки Петри диаметром 6 см посеять по 10^6 клеток в 10 мл БСИ, содержащей 15% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, и добавить химически чистый диметилсульфоксид (нестерилизованный или стерилизованный автоклавированием в небольшом объеме) до концентрации 2%. Через 5—6 дней инкубации клетки промыть ФСБ и лизировать в дистиллированной воде. Содержание гемоглобина можно оценить, измеряя оптическую плотность просветленной надосадочной фракции при 415 нм. Можно также инкубировать клетки с ^{59}Fe и оценивать синтез гемоглобина по радиоактивности гема, экстрагированного из лизата клеток.

15.2. Кожа и кератиноциты

Дифференцировка эпидермальных клеток в базальный слой делящихся клеток и верхний слой или слои клеток, которые кератинизируются и впоследствии слущиваются, представляет

относительно простую систему и может быть еще более упрощена благодаря способности кератиноцитов к росту в культуре.

Такая система in vitro может быть использована для изучения не только дифференцировки кожи и различных ее патологических изменений, но также и для тестирования лекарственных препаратов, влияющих на эпидермис человека, а возможно, и для получения большого количества эпидермальных клеток, которые можно было бы использовать при трансплантации кожи.

Поддержание и рост эпидермальных клеток зависят от присутствия фибробластов или продуктов их жизнедеятельности, и при оптимальном соотношении этих двух типов клеток в культуре наблюдается хороший рост и дифференцировка клеток. Однако продолжительность жизни таких клеток ограничена 20—50 генерациями (Hayflick, Moorhead, 1961), что значительно ниже продолжительности жизни клеток в базальном слое эпидермиса человека, которые претерпевают 30 делений в год. Продолжительность жизни клеток в культуре может быть увеличена до 150 генераций добавлением эпидермального ростового фактора (Rheinwald, Green, 1977; см. разд. 7.7.2). Содержание cAMP также может играть существенную роль в регуляции роста (Green, 1978).

Ниже описан метод выращивания кератиноцитов из полученных биопсией кусочков кожи с использованием фидерного слоя (Rheinwald, Green, 1975). В качестве фидерных клеток можно использовать клетки 3T3 или BHK21, обработанные гамма-лучами или митомицином С, как описано в разд. 8.1.5.

— Разрезать кусочки кожи (разд. 6.3) в МСИ в модификации Дюльбекко с 10% сыворотки (приложение 1) и тонко измельчить.
— Перемешивать в 10 мл 0,25%-ного трипсина в ФСБ-А при 37 °С.
— Каждые 30 мин давать оседать комкам ткани в течение 1 мин и удалять надосадочную жидкость, заменяя ее свежим трипсином.
— Осадить клетки из надосадочной жидкости и ресуспендировать их в ростовой среде, содержащей 20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и гидрокортизон (0,4 мкг/мл). Это ускоряет рост и делает морфологию колоний более упорядоченной.
— Смешать с суспензией фидерных клеток и распределить клетки по чашкам. Соотношение двух типов клеток влияет на характер последующего роста.
— Чашки с культурами не следует трогать, поскольку эпидермальным клеткам требуется для прочного прикрепления 2—3 суток. После этого времени среду нужно менять дваж-

ды в неделю. Рост фибробластов в этих условиях бывает в основном подавлен, а эпидермальные клетки образуют колонии кератиноцитов, вытесняющие фидерный слой к периферии.

— Для пересева кератиноцитов следует вначале обработать культуру 0,02% ЭДТА в течение 15 с и интенсивно пипетировать для избирательного удаления фибробластов.

— После этого дезагрегировать колонии кератиноцитов с помощью 0,02% ЭДТА и 0,05% трипсина (1 : 1). При пересеве кератиноцитов в случае необходимости добавлять новый фидерный слой.

Если культуры не пересевать, то клетки полностью заполняют монослой и начинают слущиваться с верхнего слоя, тогда как клетки базального слоя продолжают делиться (Green, 1977). Таким образом, эта система близко напоминает многослойный эпителий in vivo, где базальные клетки размножаются, а не базальные клетки дифференцируются.

15.3. Клетки тератокарциномы

Тератомам и тератокарциномам посвящены два опубликованных в последние годы обзора (Hogan, 1977; Illmensee, Stevens, 1979). Тератомы представляют собой опухоли, возникающие в яичниках или семенниках или у зародышей, на ранних стадиях развития трансплантированных во внематочные участки. Тератомы состоят из многих тканей, среди которых можно различить кожу, нервы, мышцы, хрящи и т. д. Если среди идентифицируемых тканей обнаруживаются недифференцированные эмбриональные клетки, то такие опухоли называются тератокарциномами и характеризуются более высокой скоростью роста и способностью к трансплантации сингенным животным (т. е. животным с тем же самым генотипом). Включение клеток мышиной тератокарциномы в клеточную массу ранних мышиных эмбрионов приводит к получению совершенно нормальных химерных взрослых особей, у которых клетки тератокарциномы оказываются включенными во многие различные ткани (Mintz, Illmensee, 1975; Papioannou et al., 1975). Таким образом, эти клетки способны к участию в нормальном морфогенезе и дифференцировке in vivo, и в настоящее время в работе многих исследователей делаются попытки воспроизвести эти события in vitro. Было получено несколько клеточных линий, которые в ответ на стимуляцию дифференцируются быстро и в предсказанном направлении.

Разработано два метода получения культивируемых клеток мышиной тератокарциномы.

1. Опухолевым клеткам дают прикрепиться к покрытому желатином дну культурального сосуда (разд. 2.3.2), что со-

провождается образованием колоний различных типов клеток, включая эмбриональные. Последние могут вытеснять дифференцированные клетки и могут быть проклонированы (гл. 8) (Rosenthal et al., 1970; Bernstine et al., 1973). Выделенные этим способом линии клеток имеют тенденцию к потере способности дифференцироваться в ходе культивирования.

2. Опухолевые клетки (асцитные или диссоциированные из со́лидных опухолей) высевают на монослой фидерных фибробластов (разд. 8.1.5). Через несколько дней в культуре можно видеть много различных видов дифференцированных клеток, и в том числе колонии эмбриональных клеток. При повторном пересеве эти клетки доминируют, но возможно, что проще отобрать их вручную и пересеять на фидерный слой (Martin, Evans, 1975a).

Будучи выделенными, недифференцированные клетки остаются гомогенными до тех пор, пока они субкультивируются в модифицированной Дюльбекко среде Игла с 5—20% сыворотки крупного рогатого скота, и снимаются с субстрата 0,25%-ным трипсином и 0,05 мМ ЭДТА в ФСБ (гл. 5) до достижения клетками полного монослоя.

Если клетки тератокарциномы достигают полного монослоя, то они могут начать дифференцироваться во многие различные типы клеток, но этот процесс не так выражен, как дифференцировка у клеток, полученных по методу 2 и перенесенных в сосуд без фидерного слоя. В этих условиях клетки плохо прикрепляются и образуют комки в суспензии. Эти комки сохраняют жизнеспособность и быстро дифференцируются (Evans, 1972), образуя внешний слой эндодермальных клеток. Присутствие эндодермы легко обнаружить по активности типичного маркера эндодермальных клеток, сериновой протеазы, активатора плазминогена (Strickland et al., 1976).

Эти агрегаты известны под названием *эмбриоидные тельца.* После 2—3 дней культивирования они развиваются в наполненные жидкостью цисты, в которых видны признаки дифференцировки. Если дать этим агрегатам прикрепиться к поверхности культурального сосуда, то из них вырастает несколько типов дифференцированных тканей, включая сокращающиеся мышцы, нервы и железистые ткани (Martin, Evans, 1975b).

Некоторые линии клеток тератомы, полученные методом 1 (например, линия клеток F9), почти полностью потеряли способность к дифференцировке. Однако недавно было показано, что дифференцировка может быть индуцирована и в этих клетках, если инкубировать их с 10^{-9} М ретиноевой кислотой (Strickland, Mahdavi, 1978). Образование эндодермы в этих дифференцирующихся клетках также выявляется по образованию активатора плазминогена.

15.4. Культуры миеломных клеток и образование антител

Зрелые дифференцированные лимфоциты в норме синтезируют и секретируют in vivo молекулы иммуноглобулинов (Ig). Миеломы (опухоли) плазматических клеток (плазмацитомы) обычно синтезируют и могут секретировать один вид иммуноглобулина (миеломный белок), хотя миеломы, полученные на ранней стадии дифференцировки лимфоцитов, могут синтезировать более одного вида Ig, например линия SAMM 368. Поскольку миеломы образуются из предварительно стимулированных лимфоцитов, то специфичность продуцируемых ими антител (Ig) неизвестна. Было показано, что часто используемая линия миеломы MOPC 315 продуцирует иммуноглобулины, обладающие сродством к нескольким из большого числа испытанных антигенов. Природа и возможности использования миелом рассматриваются в специальных обзорах (Potter, 1972, 1975, 1976; Rabbitts, Milstein, 1977).

Плазмацитомы могут возникать спонтанно или могут быть индуцированы (обычно в инбредных линиях мышей BALB/c или NZB) введением минерального масла или пластиковых пластинок. Опухоли обычно пассируются на мышах в со́лидной или асцитной форме, но могут быть также адаптированы к росту in vitro, где они, как правило, растут в суспензии; в этих условиях, однако, они имеют тенденцию к потере Ig-синтетической активности.

Клетки плазмацитом гипердиплоидны и характеризуются высокой скоростью роста. Они растут в среде RPMI 1640 (гл. 7 и приложение 1) с 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и 1% глутамина. Они слабо прикрепляются к поверхности, но могут расти в стационарной культуре или во вращающихся бутылях при плотности $2 \cdot 10^5$—$8 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл. Клетки можно отделить от субстрата встряхиванием бутыли.

Антитела служат мощным инструментом, когда требуется охарактеризовать поверхностные белки (антигены) клеток, и могут быть использованы также для маркировки субпопуляции клеток. Особенно важное значение приобретают антитела, когда речь идет о специфических событиях, происходящих на поверхности клеток.

Главной проблемой является индукция антител, специфических к индивидуальным молекулам клеточной поверхности. Если антитела индуцируются иммунизацией особей одного вида клетками или субклеточными фракциями другого вида, то иммунный ответ оказывается сложным и антисыворотка требует значительного фракционирования и очистки.

При попытках обойти эту проблему было предложено (Kohler, Milstein, 1975, 1976) гибридизовать (гл. 13) клетки мыши-

ной миеломы с клетками селезенки мышей, иммунизированных эритроцитами овцы. Гибридные клетки клонировали и отбирали клоны, секретирующие антитела к эритроцитам овцы. При слиянии клеток мышиной миеломы с клетками селезенки мышей, иммунизированных мембранами тимоцитов крысы, было выделено 5 клонов, продуцирующих различные антитела к тимоцитам крыс (Williams et al., 1977).

10^7 клеток, полученных из миеломы MOPC21 (Horibata, Harris, 1970), сливали с 10^8 клеток селезенки с помощью полиэтиленгликоля (гл. 13), и слившиеся клетки разносили по 48 лункам пластинки для культуры ткани (пластинки Linbro BCL-5041; см. приложение 3). Клетки инкубировали в модифицированной Дюльбекко МСИ, содержащей 10% лошадиной сыворотки и HAT (разд. 13.5) в атмосфере воздуха с 10% CO_2. Среду из каждой лунки периодически тестировали с помощью радиоиммунологического теста на наличие антител к тимоцитам крысы и культуры, дающие положительную реакцию, клонировали, используя технику культивирования в полужидком агаре (разд. 8.1.4).

15.5. Дифференцировка мышечных клеток

Переход от делящихся миобластов к многоядерным мышечным волокнам представляет собой один из наиболее ярких примеров терминальной дифференцировки, которая может происходить in vitro. Биохимические изменения приводят к развитию электровозбудимой мембраны, сборке сократительного аппарата и появлению соответствующих ферментов. Более подробно с этим процессом можно ознакомиться в обзоре Букингэма (Buckingham, 1977).

Дополнительным фактором, привлекающим внимание к превращению миобластов в миотрубки, является синхронность, с которой дифференцировка происходит in vitro. Миогенез можно наблюдать в первичной культуре эмбриональных скелетных мышц (разд. 6.6), но он может быть также индуцирован в диплоидных линиях миобластов (Richter, Yaffe, 1970), позволяющих проводить отбор мутантов (гл. 13), резистентных к ядам или температурно-чувствительных по дифференцировке (Loomis et al., 1973; Somers et al., 1975). Были получены линии миобластов (Holtzer et al., 1975; Fiszman, Fuchs, 1975), трансформированных температурно-чувствительными вирусами (разд. 13.3 и 14.4). При пермиссивной температуре клетки этий линий непрерывно размножаются, но при повышении температуры индуцируется дифференцировка.

Миобласты могут дифференцироваться и сливаться без сопутствующего синтеза ДНК (Nadel-Ginard, 1978).

15.6. Дифференцировка жировых клеток

Из клеток 3Т3, исходно полученных из мышиных эмбрионов, были выделены два клона (Todaro, Green, 1963; Green, Meuth, 1974), которые в стационарной фазе накапливают большое количество триглицеридов в многочисленных цитоплазматических капельках. Стационарная фаза устанавливается, когда клетки достигают полного монослоя, но может быть синхронно индуцирована путем инокуляции суспензии трипсинизированных клеток в среду Игла, содержащую 20—30% сыворотки теленка и карбоксиметилцеллюлозу (см. разд. 14.4.2).

Все клетки сохраняют при этом способность синтезировать коллаген (т. е. остаются фибробластами), и лишь часть клеток в сериях различных субклонов действительно продуцируют липиды, причем эта фракция клеток никогда не достигает 100% даже после нескольких недель культивирования клеток в стационарной фазе.

Способность клеток к индуцированному синтезу и запасанию триглицеридов подавляется при обработке пролиферирующих (но не покоящихся) клеток бромдезоксиуридином (5 мкМ). Это соединение, как известно, нарушает и другие системы дифференцировки (Rutter et al., 1973) в концентрации, не оказывающей влияния на скорость роста клеток.

Глава 16

Приложения

Приложение 1. Составы сред

ТАБЛИЦА 1

Сбалансированные буферные солевые растворы (СБСР) Эрла и Хэнкса, концентрированные в 10 раз, без бикарбоната и глюкозы

	Довести до 10 л	
	раствор Эрла	раствор Хэнкса[1])
NaCl	680 г	800 г
KCl	40 г	40 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20 г	20 г
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	—	9 г
KH_2PO_4	—	6 г
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	14 г	—
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$[2])	39,3 г	27,6 г
Феноловый красный (1%) — табл. 7	150 мл	150 мл
Дистиллированная вода	до 10 л	до 10 л

[1]) В некоторых случаях в СБСР Хэнкса половина $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ замещается на $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

[2]) Этот компонент лучше растворить отдельно и добавить в последнюю очередь при помешивании.

Добавить к СБСР 10 мл хлороформа и хранить при 4 °С в полиэтиленовых сосудах.

ЛКМС (лишенная кальция и магния среда) представляет собой СБСР Эрла, не содержащий кальция и магния.

СБСР может быть использован в качестве солевого раствора, в частности, для промывания фрагментов ткани. В этом случае 50 мл 10-кратного концентрата смешивают с 450 мл дистиллированной воды. Если же СБСР используется в качестве основы для составления культуральной среды (когда дополнительные ингредиенты добавляют позднее), то 50 мл 10-кратного концентрата следует смешивать с 350 или 400 мл дистиллированной воды. Раствор в бутылях объемом 500 мл следует автоклавировать при 1 атм в течение 20 мин. Стерилизованный СБСР можно хранить при комнатной температуре.

Перед употреблением довести pH до 7,4, добавив бикарбонат (20 мл 5,6%-ного раствора в СБСР Эрла и 3 мл 5,6%-ного раствора в СБСР Хэнкса) или буфер Hepes (5 мл 1,0 М). Добавить глюкозу и другие требуемые ингредиенты.

ТАБЛИЦА 2

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) Дюльбекко

Раствор ФСБ-А	1 л	10 л
$NaCl$	10 г	100 г
KCl	0,25 г	2,5 г
Na_2HPO_4	1,44 г	14,4 г
KH_2PO_4	0,25 г	2,5 г
*p*H 7,2		

Буфер разлить в бутыли объемом 160 или 400 мл.
Для стерилизации автоклавировать при давлении 1 атм в течение 20 мин.
Хранить при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-Б	1 л
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0 г

Буфер разлить в бутыли объемом 20 или 50 мл.
Для стерилизации автоклавировать при давлении 1 атм в течение 15 мин.
Хранить при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-В	1 л
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 г

Буфер разлить в бутыли объемом 20 или 50 мл.
Для стерилизации автоклавировать при давлении 1 атм в течение 15 мин.
Хранить при комнатной температуре.

Для получения полного ФСБ смешать 20 мл ФСБ-В и ФСБ-С с 160 мл ФСБ-А, либо 50 мл ФСБ-Б, и ФСБ-В смешать с 400 мл ФСБ-А.

ТАБЛИЦА 3

Бикарбонат натрия (5,6%).

— Растворить 56 г $NaHCO_3$ в дистиллированной воде. Добавить 1,5 мл 1%-ного раствора фенолового красного и довести объем до 1 л.
— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.
— Разлить в бутыли объемом 20, 100 и 200 мл.
— Тщательно закупорить бутыли, используя по возможности резиновые пробки с металлической окантовкой.

— Проверить аликвоты растворов на бактериальное заражение, используя
  а) жидкую среду Саборада при 31 °С в течение 1 недели (приложение 4),
  б) бульон с экстрактом сердца и мозга при 37 °С в течение 1 недели (приложение 4).
— Хранить при комнатной температуре.

ТАБЛИЦА 4

Глюкоза (10%; вес/объем)

— Растворить 100 г глюкозы в дистиллированиой воде.
— Довести объем раствора до 1 л.
— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.
— Разлить в бутыли объемом 5 и 10 мл и хранить при —20 °С.

ТАБЛИЦА 5

Буфер Hepes

— Растворить 47,6 г буфера Hepes в 200 мл дистиллированной воды и довести pH до 8,1 с помощью NaOH.
— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и хранить алнквотами по 5 мл при комнатной температуре.
— Проверить на бактериальное заражение, используя
  а) жидкую среду Саборада при 31 °С в течение 1 недели (приложеиие 4),
  б) бульон с экстрактом сердца и мозга при 37 °С в течение 1 неделн (приложение 4).

ТАБЛИЦА 6

Раствор антибиотиков (100-кратный концентрат).

Натрийбензилпенициллин G (Кристопен)	10 000 000 ед.
Стрептомицин сульфат	10 г
Дистиллированная вода	до 1 л

— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.
— Разлить в бутыли объемом 5, 20 и 50 мл.
— Проверить на бактериальное заражение, используя
  а) жидкую среду Саборада при 31 °С в течение 1 недели (приложение 4),
  б) бульон с экстрактом сердца и мозга при 37 °С в течение 1 недели (приложение 4).
— Хранить при —20 °С.

Пенициллин и стрептомицин могут быть получены от Glaxo Labs. (см. приложение 3).

ТАБЛИЦА 7

Феноловый красный 1% (для использования в качестве индикатора в СБСР и культуральных средах).

— Растворить 10 мл фенолового красного в 245 мл дистиллированной воды с 5 мл 5 н. NaOH.
— Добавлять по каплям 1 н. HCl, пока раствор не приобретает глубокий кроваво-красный цвет.
— Довести объем до 1 л дистиллированной водой.
— Профильтровать через фильтровальную бумагу ватман № 1.
— Разлить в бутыли и хранить при 4 °С.

ТАБЛИЦА 8

Заменимые аминокислоты Игла (100-кратный концентрат).

	г/л
L-Аланин	0,89
L-Аспарагин-H_2O	1,50
L-Аспарагиновая кислота	1,33
L-Глутаминовая кислота	1,47
Глицин	0,75
L-Пролин	1,15
L-Серин	1,05

ТАБЛИЦА 9

Гидролизат лактальбумина поставляется Nutritional Biochemicals (США) в виде сухого порошка; хранится в темных закупоренных сосудах. Гидролизат растворяют до 5%-ной концентрации в СБСР Хэнкса и автоклавируют при 115 °С в течение 10 мин, после чего его можно хранить при комнатной температуре в течение месяца или более. При хранении в замороженном состоянии образуется осадок, растворяющийся при нагревании в кипящей водяной бане. Перед использованием концентрат разводят культуральной средой в 10 раз до концентрации 0,5%.

ТАБЛИЦА 10

Экстракт куриного эмбриона

— Извлечь асептически из яиц 10-дневных эмбрионов (как описано в разд. 6.8) и промыть их в СБСР Хэнкса. Гомогенизировать в блендоре в течение 60 с при максимальной скорости в равном объеме СБСР Хэнкса.
— Инкубировать в течение 1 ч при 4 °С и центрифугировать при 35 000 g 20 мин.

Заморозить надосадочную фракцию при —20 °С в течение ночи.

Затем разморозить, повторно центрифугировать и аликвоты повторно заморозить для хранения.

ТАБЛИЦА 11

Триптозофосфатный бульон

Триптозофосфатный бульон (Oxoid или Difco bacto; приложение 3)	147,5 г
Дистиллированная вода	до 5 л

— Разлить по 50 мл в 4-унциевые[1] плоские медицинские флаконы.

[1] Одна унция равна 28,35 г. — *Прим. ред.*

— Стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин.
— Инкубировать при 37 °С в течение 7 дней.
— Проверить каждую бутыль на мутность перед хранением при комнатной температуре.

ТАБЛИЦА 12

Состав сред Игла (аминокислоты и витамины)

	БСИ	МСИ	МСИ Глазго	МСИ Дюльбекко
Аминокислоты (мг/л)				
L-аргинин-HCl		126,0	42,0	84,0
L-аргинин	17,4			
L-цистин	12,0	24,0	24,0	48,0
L-глутамин	292,0	292,0	292,0	584,0
L-глицин				30,0
L-гистидин-HCl·H_2O		42,0	21,0	42,0
L-гистидин	8,0			
L-изолейцин	26,0	52,0	52,4	105,0
L-лейцин	26,0	52,0	52,4	105,0
L-лизин-HCl		72,5	73,1	146
L-лизин	29,2			
L-метионин	7,5	15,0	15,0	30,0
L-фенилаланин	16,5	32,0	33,0	66,0
L-серин				42,0
L-треонин	24,0	48,0	47,6	95,0
L-триптофан	4,0	10,0	8,0	16,0
L-тирозин	18,0	36,0	36,2	72,0
L-валин	23,5	46,0	46,8	94,0
Витамины (мг/л)				
Биотин	1,0			
D-Са-пантотенат	1,0	1,0	1,0	4,0
Холинхлорид	1,0	1,0	1,0	4,0
Фолиевая кислота	1,0	1,0	1,0	4,0
i-инозитол	2,0	2,0	2,0	7,2
Никотинамид	1,0	1,0	1,0	4,0
Пиридоксаль-HCl	1,0	1,0	1,0	4,0
Рибофлавин	0,1	0,1	0,1	0,4
Тиамин-HCl	1,0	1,0	1,0	4,0

Аминокислоты и витамины растворяют в СБСР Эрла или Хэнкса. МСИ в модификации Дюльбекко готовят на СБСР Эрла, содержащем избыточные количества бикарбоната (3,7 г/л) и глюкозы (4,5 г/л), а также нитрат железа (0,1 мг $Fe(NO_3)\cdot 9H_2O$ в 1 л).

Составы сред соответствуют первоначально предложенным Иглом (Eagle, 1955a, 1959).

ТАБЛИЦА 13

10-кратный концентрат МСИ

Коммерческие поставки (например, от Flow Laboratories или Gibco-Biocult; см. приложение 3) включают в себя 50-кратные концентраты аминокислот и 100-кратные концентраты витаминов МСИ. Концентраты аминокислот можно хранить при комнатной температуре, но концентраты витаминов должны быть заморожены вплоть до непосредственного использования.

Аминокислоты и витамины можно смешивать в асептических условиях, но поскольку к конечному раствору следует добавлять глюкозу и глутамин, нуждающиеся в стерилизации фильтрованием, то удобнее стерилизовать готовый 10-кратный концентрат:

Аминокислоты МСИ[1] (50-кратный концентрат)	200 мл
Витамины МСИ (100-кратный концентрат)	100 мл
L-глутамин[2]	2,925 г
Глюкоза	45 г
Перегнанная в стекле дистиллированная вода	до 1 л

— Довести pH до 7,1, используя 5 н. NaOH (примерно 10 мл).
— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.
— Разлить в бутыли объемом 50, 100, 200 и 400 мл.
— Проверить на бактериальное заражение, используя
  а) жидкую среду Саборада при 31 °С в течение 1 недели (приложение 4),
  б) бульон с экстрактом мозга и сердца при 37 °С в течение 1 недели (приложение 4).
— Хранить при 4 °С до получения результатов проверки.

ТАБЛИЦА 14

10-кратный концентрат МСИ в модификации Дюльбекко

Концентрат готовится так же, как и 10-кратный концентрат МСИ, но с ис-

[1] Для приготовления МСИ в модификации Глазго использовать 200 мл 100-кратного концентрата БСИ.

[2] L-глутамин можно добавлять не на этой стадии, а непосредственно к разведенной среде перед использованием (1 мл 200 мМ раствора на 100 мл среды).

пользованием 25-кратного концентрата аминокислот Дюльбекко.

	для приготовления 1 л
25-кратный концентрат аминокислот Дюльбекко	400 мл
100-кратный концентрат витаминов МСИ	400 мл
Глюкоза	45 г
Дистиллированная вода	200 мл
Довести pH до 7,1, используя 5 н. NaOH	

— Стерилизовать фильтрованием, используя мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.
— Разлить в бутыли объемом 50 и 100 мл.
— Проверить на бактериальное заражение, как указывалось выше.

Примечание. L-глутамин добавляется к разведенной среде непосредственно перед использованием (10 мл 200 мМ глутамина на 500 мл среды).

ТАБЛИЦА 15

Приготовление среды Игла из концентратов

Приведенные ниже прописи основаны на использовании 10-кратного концентрата МСИ без солей (см. табл. 13) или 10-кратного концентрата МСИ в модификации Дюльбекко (см. табл. 14). В том случае, когда 10-кратный концентрат содержит соли (например, при приготовлении из сухой среды), то его следует разводить не СБСР, а перегнанной в стеклянной посуде стерильной дистиллированной водой.

а) *Минимальная среда Игла с 10% сыворотки теленка* (МСИ10). Используется в качестве ростовой среды для наиболее распространенных клеточных линий, таких, как L929, HeLa, CHO, BHK21/C13, и некоторых линий клеток, трансформированных вирусом полиомы. При добавлении в среду пролина поддерживает рост линий клеток CHO pro⁻.

СБСР[1)]	450 мл
МСИ 10-кратный концентрат	50 мл
$NaHCO_3$ (5,6%; табл. 3)	20 мл
Сыворотка теленка	50 мл
Антибиотики (100-кратный концентрат; табл. 6)	5 мл

б) *Модификация Глазго МСИ с 10% сыворотки теленка и 10% триптозофосфатного бульона.* Обеспечивает улучшенный рост культуры клеток ВНК21/С13 и некоторых трансформированных вирусом полиомы линий.

СБСР[1]	400 мл
МСИ Глазго, 10-кратный концентрат	50 мл
$NaHCO_3$ (5,6%; табл. 3)	20 мл
Сыворотка теленка	50 мл
Триптозофосфат (табл. 11)	50 мл
Антибиотики (100-кратный концентрат; табл. 6)	5 мл

в) *Минимальная среда Игла с 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота и заменимыми аминокислотами.* Рекомендуется для выращивания клеток BSCl, CV1 и PT-K; кроме того, обеспечивает лучший рост клеток L929 и HeLa.

СБСР[1]	450 мл
МСИ, 10-кратный концентрат	50 мл
$NaHCO_3$ (5,6%; табл. 3)	20 мл
Сыворотка эмбриона крупного рогатого скота	50 мл
Заменимые аминокислоты Игла (100-кратный концентрат; табл. 8)	5 мл
Антибиотики (100-кратный концентрат; табл. 6)	5 мл

г) *В МСИ Дюльбекко* могут быть добавлены 10% сыворотки теленка, 20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота или их смесь.

СБСР[1]	400 мл
МСИ Дюльбекко, 10-кратный концентрат	50 мл
$NaHCO_3$ (5,6%; табл. 3)	30 мл
Сыворотка эмбриона крупного рогатого скота	100 мл
Антибиотики (100-кратный концентрат; табл. 6)	5 мл
Глутамин 200 мМ	10 мл

Примечание. Все ингредиенты следует асептически добавлять в бутыли с СБСР, а среду перед использованием необходимо прогревать при 37 °С. Среду можно хранить при 4 °С в течение 2—3 недель.

В отсутствие антибиотиков (как чаще всего рекомендуется) образцы ростовой среды следует инкубировать при 37 °С в течение 3 суток и при комнатной температуре в течение последних 2 суток. Бутыли, в которых обнаруживается загрязнение микроорганизмами, следует отбрасывать.

---

[1] СБСР во всех случаях готовят из 50 мл 10-кратного концентрата СБСР, разведенного до соответствующего объема дистиллированной водой и стерилизованного автоклавированием (табл. 1).

ТАБЛИЦА 16

Среда Хэма F12
Согласно прописи Хэма (Ham, 1965).

	мг/л
Аминокислоты	
L-аланин	3,91
L-аргинин-HCl	210,7
L-аспарагин	15,01
L-аспарагиновая кислота	13,31
L-цистеин-HCl·H_2O	35,12
L-глутаминовая кислота	14,71
L-глутамин	146,2
Глицин	7,51
L-изолейцин	3,94
L-лейцин	13,12
L-лизин-HCl	36,54
L-метионин	4,48
L-фенилаланин	4,96
L-пролин	34,53
L-серин	10,51
L-треонин	11,91
L-триптофан	2,04
L-тирозин	5,44
L-валин	11,71
Витамины	
Биотин	0,007
Са-пантотенат	0,258
Холинхлорид	13,96
Фолиевая кислота	1,324
Липоевая кислота	0,206
Ниацинамид	0,037
Пиридоксин-HCl	0,062
Рибофлавин	0,038
Тиамин-HCl	0,337
Витамин B12	1,357
Соли	
KCl	223,65
NaCl	7,6
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	268,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,834
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	122,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	44,11
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,863
$NaHCO_3$	1,176
Другие компоненты	
Феноловый красный	1,242
Глюкоза	1801,6
Na-пируват	110,1
Путресцин-2HCl	0,161
Гипоксантин	4,083
Мио-инозитол	18,02
Тимидин	0,727
Линолевая кислота	0,084

ТАБЛИЦА 17

Среда Мак-Коя 5а (RPMI 1629)
Исходная пропись Мак-Коя и др. (McCoy et al., 1959) с более поздними модификациями (Hsu, Kellogg, 1960; Iwakata, Grace, 1964)

	мг/л
Аминокислоты	
L-аланин	13,90
L-аргинин-HCl	42,10
L-аспарагин	45,00
L-аспарагиновая кислота	19,97
L-цистеин	31,50
L-глутаминовая кислота	22,10
L-глутамин	219,20
Глицин	7,50
L-гистидин-HCl·H_2O	20,96

	мг/л		мг/л
L-гидроксипролин	19,70	*n*-Аминобензойная кислота	1,00
L-изолейцин	39,36	Пиридоксаль-HCl	0,50
L-лейцин	39,36	Пиридоксин-HCl	0,50
L-лизин-HCl	36,50	Рибофлавин	0,20
L-метионин	14,90	Тиамин-HCl	0,20
L-фенилаланин	16,50	Витамин B12	2,00
L-пролин	17,30	Соли	
L-серин	26,30	$CaCl_2$	100,0
L-треонин	17,90	KCl	400,0
L-триптофан	3,10	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,0
L-тирозин	18,10	NaCl	6460,0
L-валин	17,60	$NaHCO_3$	2200,0
Витамины		$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	580,0
Аскорбиновая кислота	0,50	Другие компоненты	
Биотин	0,20	Феноловый красный	10,0
Холинхлорид	5,00	Глюкоза	3000,0
D-Ca-пантотенат	0,20	Глутатион	0,50
Фолиевая кислота	10,00	Бакто-пептон	600,0
i-инозит	36,00	Сыворотка эмбриона крупного рогатого скота	0—30%
Никотинамид	0,50		
Никотиновая кислота	0,50		

ТАБЛИЦА 18

Среда 199

В прописи Моргана и др. (Morgan et al., 1950, 1955).

	мг/л		мг/л
Аминокислоты		D,L-изолейцин	40,0
L-аланин	50,0	D,L-лейцин	120,0
L-аргинин-HCl	70,0	L-лизин-HCl	70,0
D,L-аспарагиновая кислота	60,0	D,L-метионин	30,0
L-цистеин-HCl	0,1	D,L-фенилаланин	50,0
L-цистин	20,0	L-пролин	40,0
L-глутаминовая кислота-H_2O	150,0	D,L-серин	50,0
L-глутамин	100,0	D,L-треонин	60,0
Глицин	50,0	D,L-триптофан	20,0
L-гистидин-HCl	20,0	L-тирозин	40,0
L-гидроксипролин	10,0	D,L-валин	50,0
		Витамины	

	мг/л		мг/л
Аскорбиновая кислота	0,050	Ниацин	0,025
d-биотин	0,010	Ниацинамид	0,025
Кальциферол	0,100	*n*-Аминобензойная кислота	0,050
Са-пантотенат	0,010	Пиридоксаль-HCl	0,025
Холинхлорид	0,500	Пиридокснн-HCl	0,025
Фолиевая кислота	0,010	Рибофлавин	0,010
i-инозитол	0,050	Тиамин-HCl	0,010
Менадион	0,010	Витамин А (ацетат)	0,14

Неорганические соли	СБСР Хэнкса мг/л	СБСР Эрла мг/л
$CaCl_2$ (безводный)	140,0	200,0
Нитрат железа $Fe(NO_3)_3$	0,1	0,1
KCl	400,0	400,0
KH_2PO_4	60,0	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,0	200,0
NaCl	8000,0	6800,0
$NaHCO_3$	350,0	2200,0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	140,0
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	60,0	—

Другие компоненты	мг/л	Другие компоненты	мг/л
Аденинсульфат	10,0	Гуанин-HCl	0,30
Аденозинтрифосфат (двунатриевая соль)	1,0	Гипоксантин	0,30
Адениловая кислота	0,20	Феноловый красный	20,0
α-Токоферолфосфат (натриевая соль)	0,01	Рибоза	0,50
Холестерин	0,20	Ацетат натрия	50,0
Дезоксирибоза	0,50	Тимин	0,30
Глюкоза	1000,0	Твин 80с	20,00
Глутатион	0,05	Урацнл	0,30
		Ксантин	0,30

ТАБЛИЦА 19

Среда NCTC 135
В прописи Эванса и др. (Evans et al., 1964).

	мг/л
Аминокислоты	
L-аланин	31,48
L-α-амино-*н*-масляная кислота	5,51
L-аргинин-HCl	31,16
L-аспарагин-H_2O	9,19
L-аспарагиновая кислота	9,91
L-цистин, двунатриевая соль	12,41
L-глутаминовая кислота	8,26
L-глутамин	135,7
Глутатион	10,00
Глицин	13,51
L-гистидин-HCl·H_2O	26,65
L-гидроксипролин	4,09
L-изолейцин	18,04
L-лейцин	20,44
L-лизин-HCl	38,43
L-метионин	4,44
L-орнитнн-HCl	9,41
L-фенилаланин	16,53
L-пролин	6,13
L-серин	10,75
Таурин	4,18
L-треонин	18,93
L-триптофан	17,5
L-тирозин	16,44
L-валин	25,00
Витамины	
L-аскорбиновая кислота	50,00
Биотнн	0,025
Холинхлорид	1,25
Кальциферол	0,25
D-Ca-пантотенат	0,025
Фолиевая кислота	0,025
i-инозитол	0,125
Тригидратменафтоибисульфит натрия	0,048
Никотиновая кислота	0,0625
Никотинамид	0,0625
n-Аминобензойная кислота	0,125
Пиридоксаль-HCl	0,0625
Пиридоксин-HCl	0,0625
Рибофлавин	0,025
Тиамин-HCl	0,025
D,L-α-токоферолфосфат, двунатриевая соль	0,025
Витамин А (ацетат)	0,29
Витамин B12	10,00
Соли	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	264,9
KCl	400,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	204,8
NaCl	6800
$NaHCO_3$	2200
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	158,3
Другие соедииения	
Кокарбоксилаза	1,0
Кофермент А	2,0
Дезоксиаденозин·H_2O	10,0
Дезоксицитидин-HCl	10,0
Дезоксигуаиозии-H_2O	10,0
FAD, двуиатриевая соль	1,00
D-глюкозамин-HCl	3,85
Глюкоза	1000,00
D-глюконолактон	1,80
5-метилцитозин	0,10
NAD	7,00
NADP, дигидрат натриевой соли	1,00
Ацетат натрия	30,14
Глюкуронат натрия·H_2O	1,80
Феноловый красный натриевый	20,0
Тимидин	10,0
Твин 80	12,50
ИТР, дигидрат тринатриевой соли	1,0

ТАБЛИЦА 20

Среда CMRL 1066
По прописи Паркера и др. (Parker et al., 1957).

	мг/л
Аминокислоты	
L-аланин	25,0
L-аргинин-HCl	70,0
L-аспарагиновая кислота	30,0
L-цистеин-HCl·H_2O	260,0
L-цистин	20,0
L-глутаминовая кислота	75,0
L-глутамин	100,0
Глицин	50,0
L-гистидин-HCl·H_2O	20,0
L-гидроксипролин	10,0
L-изолейцин	20,0
L-лейцин	60,0
L-лизин-HCl	70,0
L-метионин	15,0
L-фенилаланин	25,0
L-пролин	40,0
L-серин	25,0
L-треонин	30,0
L-триптофан	10,0
L-тирозин	40,0
L-валин	25,0
Витамины	
Аскорбиновая кислота	50,000
Биотин	0,010
Са-пантотенат	0,010
Холестерин	0,200
Холинхлорид	0,500
Фолиевая кислота	0,010
i-Инозитол	0,050
Ниацин	0,250
Ниацинамид	0,025
n-Аминобензойная кислота	0,050

	мг/л
Пиридоксаль-HCl	0,025
Пиридоксин-HCl	0,025
Рибофлавин	0,010
Тиамин-HCl	0,010
Неорганические соли	
$CaCl_2$ (безводный)	200,0
KCl	400,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,0
NaCl	6799,0
$NaHCO_3$	2200,0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	140,0
Другие компоненты	
Кокарбоксилаза	1,0
Кофермент А	2,5
Дезоксиаденозин	10,0
Дезоксицитидин	10,0
Дезоксигуанозин	10,0
Дифосфопиридиннуклеотид	7,0
Этанол	16,0
Флавинадениндинуклеотид	1,0
Глюкоза	1000,0
Глутатион	10,1
5-Метилдезоксицитидин	0,1
Феноловый красный	20,0
Ацетат натрия·$3H_2O$	83,0
Глюкуронат натрия×$\times H_2O$	4,2
Тимидин	10,0
Трифосфопиридиннуклеотид	1,0
Твин 80	5,0
Уридинтрифосфат	1,0

Приложение 2. Красители и фиксаторы

В монографии неоднократно упоминались различные красители и фиксаторы, которые можно найти с помощью предметного указателя. Ниже приведены наиболее часто используемые.

1. Ацетат-орсеин

— Фиксировать клетки в смеси метанол : уксусная кислота (3 : 1) и высушить на воздухе.
— Окрашивать 3—5 мин 2%-ным орсеином в 4%-ной уксусной кислоте.
— Промыть в 40%-ном метаноле и высушить на воздухе.

2. Флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый

К суспензии клеток в СБСР добавить каплю водного 0,01%-ного раствора акридинового оранжевого. При наблюдении в люминесцентном микроскопе ядра обладают зеленой флуоресценцией, а цитоплазма — красной.

3. Фиксатор Карнуа

1 часть ледяной уксусной кислоты
3 части абсолютного этанола

4. Формоловый солевой раствор

— Растворить 5 г NaCl и 15 г Na_2SO_4 в дистиллированной воде и довести объем до 900 мл.
— Отфильтровать 40%-ный формальдегид через бумажный фильтр Грина № 904 1/2 и добавить 100 мл к солевому раствору.

5. Краситель Гимза

— К 30 г красителя Гимза добавить 1980 мл глицерина.
— Прогреть при 56 °С в течение 90—120 мин.
— Добавить 1980 мл метанола и хорошо перемешать.
— Выдержать при комнатной температуре в течение 7 суток и профильтровать через бумажный фильтр Грина № 904 1/2.

Перед использованием развести в соотношении 1/10 забуференной дистиллированной водой или использовать неразведенным.

6. Краситель Грама

а. Метиловый фиолетовый 6В	8 г
Абсолютный этанол	80 мл
1%-ный водный раствор оксалата аммония	320 мл
б. Иод	1 г
Иодид натрия	2 г
Дистиллированная вода	100 мл
в. Сафранин	2,5 г
Этанол	100 мл
Дистиллированная вода	до 1 л

— Нанести раствор метилового фиолетового (а) на фиксированные препараты и удалить его через 30 с.
— Промыть проточной водой.
— Поместить препарат на 1 мин в раствор йода (б).
— Промыть водой и обесцвечивать этанолом, пока краситель не перестанет отмываться.
— Опустить на 2 мин в раствор противокрасителя, сафранина (в).
— Промыть водой и высушить при комнатной температуре.
— Исследовать в микроскопе под масляной иммерсией.

7. Гематоксилин и эозин

Гематоксилин растворяют в 95%-ном этаноле и к 6 мл 17%-ного раствора добавляют 100 мл насыщенного раствора аммониевых квасцов и 0,5 г оксида ртути. После кипячения и охлаждения добавляют 25 мг глицерина и 25 мл метанола; получившуюся смесь фильтруют.
— Окрасить фиксированные клетки в течение ночи в растворе гематоксилина, разведенном в 100 раз.
— Промыть водой в течение 15 мин.
— Окрасить в 0,5%-ном эозине Y в течение 0,5—1 мин и ополоснуть.
— Обезводить в 95%-ном и абсолютном этанолах.
Ядра окрашиваются в голубой, а цитоплазма в красный цвет.

8. Окраска по Лейшману

— К 7,5 г красителя Лейшмана добавить 5 л метанола и периодически встряхивать в течение 5 суток перед использованием.

9. Окраска по Мэй-Грюнвальд — Гимза

— Смешать 9 мл раствора Гимза (0,3%-ный раствор в глицерине, метаноле) с 90 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 6,8 и добавить 1 мл красителя Мэй-Грюнвальд (0,25% в метаноле; вес/объем).

10. Метиленовый синий

Краситель представляет собой смесь 30 мл насыщенного этанольного раствора метиленового синего со 100 мл 0,01%-ного водного KOH.
— Окрасить препараты в течение 3 мин и промыть водой.
— Насухо промокнуть фильтровальной бумагой и исследовать под масляной иммерсией.

При окрашивании этим красителем все бактерии лучше видны при использовании объективов с большим увеличением.

11. Окраска орсеином

2%-ный раствор природного орсеина (Curr) в 60%-ной ледяной уксусной кислоте готовят, растворяя орсеин в кипящей ледяной уксусной кислоте при помешивании. Раствор охлаждают до 55 °С и добавляют дистиллированную воду, чтобы концентрация кислоты снизилась до 60%. Раствор охлаждают до комнатной температуры и дважды фильтруют через фильтровальную бумагу ватман № 1.

Приложение 3. Фирмы, поставляющие приборы и реактивы

Ниже перечислены фирмы, с которыми автор имел контакты по ходу своей работы. Список не является исчерпывающим и наличие в списке той или иной фирмы отнюдь не означает, что автор рекомендует использовать продукцию

именно этой фирмы. Среди фирм-поставщиков и их агентов преобладают британские и шотландские фирмы, что также основано преимущественно на личном опыте автора. Более подробная информация может быть получена в Laboratory Equipment Directory, ежегодно публикуемом Morgan-Grampian Book Publishing Co. Ltd., 30 Calderwood St., London, SE15, 6QH.

Abbot Laboratories, North Chicago, Il, USA.
American Type Tissue Collection, Rockville, MD 20852, USA.
Amicon Ltd., 57 Queen's Road, High Wycombe, Bucks.
Anderman and Co. Ltd., Central Avenue, East Molesey, Surrey KT8 OQZ.
Becton Dickinson U. K. Ltd., (Falcon Plastics) York House, Empire Way, Wembley, Middlesex HA9 OPS.
Bellco, see A. R. Horwell Ltd.
A and J. Beveridge Ltd., 5 Bonnington Road Lane, Edinburgh EH6 5BP.
Bioassay Systems (L. H. Engineering Co. Ltd.) Bells Hill, Stoke Poges, Bucks, SL2 4EG.
Bio-Rad Laboratories Ltd., Caxton Way, Holywell Industrial Estate, Watford, Herts. WD1 8RP.
British Drug Houses Ltd., Poole, Dorset BH12 4 NN.
British Oxygen Co., 150 Polmadie Road, Glasgow G5.
A. Browne Ltd., Chancery House, Abbey Gate, Leicester LE4 OAA.
Calbiochem Ltd., 79/81 South Street, Biscops Storford, Herts. CM23 3AL.
Charles Austen Pums Ltd., 100 Royston Road, Byfleet, Surrey.
Connaught Laboratories, see A. R. Horwell Ltd.
Cornig Ltd., Halstead, Essex CO9 2DX.
Coulter Electronics Ltd., Coldharbour Lane, Harpenden, Herts. AL5 4UN.
Decon Laboratories Ltd., Ellen Street, Portslade, Brighton BN4 IEQ.
Difco Laboratories, P. O. Box No. 14B, Central Avenue, East Molesey, Surrey KT8 OSE.
Distillers Co., Ltd., Port Dundas Distillery, 74, North Canal Bank Street, Glasgow G4.
Dow Corning Co., see McFarlane Robson.
Durham Chemical Distributors, Birtley, Tyne and Weir.
Dynatech Labs. Ltd., see Gibco-Biocult.
Elga Group, Lane End. High Wycombe, Bucks.
Epsom Glass Industries Ltd., see McFarlane Robson.
Evans Medical Supplies Ltd., Ruislip, London.
Falcon Plastics, see Becton Dickinson U. K. Ltd.
Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leics. LE11 ORG.
Flow Laboratories, Victoria Park, Heatherhouse Road, Irvine, Ayrshire.
Forma CO_2 Incubators-Raven Scientific Ltd., P. O. Box 2, Haverhill, Suffolk.
A. Gallenkamp and Co. Ltd., Braeview Place, Nerston, East Kilbride Glasgow G74 3XJ.
Gelman Hawksley and Sons Ltd., Harrenden Road, Brackmills, Northampton.
Gibco-Biocult Labs. Ltd., 3 Washington Road, Sandyford Industrial Estate, Paisley PA3 4EP.
Glaxo Laboratories Ltd., Greenford, Middlesex.
Grant Instruments Ltd., Barrington, Cambridge CB2 5QZ.
Green's Filter Paper, see Whatman Lab. Sales Ltd.
G. T. Gurr Ltd., see Searle Scientific Services.
W. C. Haraeus GmbH, Postfach 169, D6450 Hanau.
Hoechst U. K. Ltd., Hoechst House, Salisbury Road, Hounslow, Middlesex TW4 6JH.
Hopkin and Williams, P. O. Box 1, Romford, RM1 1HA.
A. R. Horwell (Bellco) 2, Grangeway, Kilburn Hing Road, London NW6 2BP.
Hotpack Ltd., see Gibco-Biocult.
V. A. Howe and Co. Ltd., 88, Peterborough Road, London SW6 3EP.
Hyflo Pums, see Metcalf Bros. Ltd.

Ilford Ltd. — Hamilton Tait Ltd., Polimadie Industrial Estate, Toryglen Street, Glasgow G5 OBH, or Ilford, London.
Kodak Ltd. (Northern Region) Dallimore Road, Wythenshawe, Manchester M23 9NJ, or Acornfield Road, Kirby Liverpool L33 7UX.
LEEC-Private Road No. 7, Colwick Estates, Nottingham NG4 2AJ.
Linbro, see Flow Laboratories.
Luckham Ltd., Labro Works, Victoria Gardens, Burgess Hill, Sussex RH15 9QV.
3M Co. Ltd., see McFarlane Robson.
May and Baker Ltd., Dagenham, Essex.
McFarlane Robson Ltd., Burnfield Avenue, Thornliebank, Glasgow G46 7TP.
Metcalf Bros Ltd., Cranbourne Road, Potters Bar, Herts.
Millipore (U. K.) Ltd., Millipore House, Abbey Road, Park Royal, London NW10 7SP.
New Brunswick Scientific (U. K.) Ltd., 40 Wellington Street, London WC2E 7BD.
Nunc, see Gibco-Biocult.
Nutritional Biochemical Corp., see Uniscience Ltd.
Olympus Microscopes, see Gallenkamp.
Oxoid Ltd., Wade Road, Basingstoke, Hants. RG24 OPW.
Petriperm, see W. C. Haraeus GmbH.
Pharmacia (G. B.) Ltd., Paramount House, 75 Uxbridge Road, Ealing, London W5 58S.
W. R. Prior and Co. Ltd., London Road, Bishop's Stortford, Herts.
Quickfit and Quartz Ltd., see McFarlane Robson.
Repelcote, see Hopkin and Williams.
Sartorious Ltd., see V. A. Howe.
Schleicher and Schuell Ltd., see Anderman and Co. Ltd.
Searle Scientific Services, Coronation Road, Cressex, High Wycombe, Bucks.
Sigma London Chem. Co. Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NH.
Techmation Ltd., 58 Edware Way, Edware HA8 8JP.
Titertek, see Flow Laboratories.
Union Carbide (U. K.) Ltd., Redworth Way, Aycliffe Industrial Est. Aycliffe, Co. Durham.
Uniscience Ltd., Uniscience House, 8 Jesus Lange, Cambridge CB5 8BA.
Vir Tis Co. Inc., Gardiner, New York 12525, see Techmation Ltd.
Voss Instruments Ltd., Faraday Works, High Street Malden, Essex CM9, 7EY.
Whatman Labsales Ltd. (Reeve Angel), c/o East Anglia Chemicals Ltd., Lady Lane Industrial Estate, Hadleigh, Ipswich 1P7 6BQ.
Wild Heerbrugg Ltd., CH-9435 Heerbrugg, Switzerland.
R. and J. Wood Ltd., 39 Back Sneddon St., Paisley PA3 2DE, Scotland.

Приложение 4. Проверка стерильности

1. Бульон с экстрактом сердца крупного рогатого скота

— Добавить 50 г экстракта сердца крупного рогатого скота (Difco Labs., Detroit) к 900 мл дистиллированной воды при 50 °С. Выдержать в течение часа.
— Медленно довести до кипения.
— Профильтровать через двойной слой фильтровальной бумаги ватман № 12.
— Разлить в бутыли и стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин.

2. Бульон с экстрактом сердца и мозга

— Растворить 37 г высушенного экстракта мозга и сердца (Oxoid, Basingstoke) в 1 л дистиллированной воды.
— Разлить по 25 и 40 мл в 2-унциевые плоские медицинские флаконы.

— Стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин.
— Хранить при комнатной температуре.

3. Жидкая среда Сабораду

— Растворить 30 г исходной жидкой среды Сабора́да (Oxoid; приложение 3) в 1 л дистиллированной воды.
— Разлить по 25 и 40 мл в 2-унциевые плоские медицинские бутыли.
— Стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм 15 мин.
— Хранить при комнатной температуре.

4. Пластинки с кровяным агаром

— Растворить 40 г исходного кровяного агара (Oxoïd, Basingstoke) в 1 л дистиллированной воды в кипящей водяной бане.
— Аликвоты в 50 мл автоклавировать при 121 °С в течение 15 мин.
— К 50 мл исходного агара (нагретого до плавления и охлажденного до 45 °С) добавить 5 мл лошадиной сыворотки.
— Разлить по 5 мл в чашки Петри диаметром 50 мм и дать остыть.

Лошадиная сыворотка может поставляться регулярно, т. е. 1 раз в две недели фирмой Oxoid Ltd. Bisingstoke.

5. PPLO-агар

А. Исходный PPLO-агар

— Для приготовления 1 л исходного PPLO-агара смешать 34,0 г бакто-PPLO-агара (Difco Labs.) с 1 л холодной дистиллированной воды и инкубировать сосуд в кипящей водяной бане вплоть до расплавления агара.
— Расплавленный агар разнести по 25 мл в 4-унциевые медицинские плоские флаконы.
— Стерилизовать автоклавированием при давлении 1 атм в течение 15 мин.
— Хранить при комнатной температуре.

Б. Пластинки с PPLO-агаром	на 10 пластинок (мл)
Исходный PPLO-агар	25
Лошадиная сыворотка	7,5
Дрожжевой экстракт (см. ниже)	3,75
Триптозофосфатный бульон	3,75
Ацетат таллия (1,25%)	0,4
Пенициллин	0,15

— Нагреть агар в водяной бане до плавления и поддерживать при 45 °С.
— Нагреть сыворотку и дрожжевой экстракт до 45 °С.
— Добавить к агару лошадиную сыворотку, триптозофосфатный бульон, дрожжевой экстракт, ацетат таллия и пенициллин.
— Тщательно размешать и разнести по 4 мл в чашки Петри диаметром 50 мм.
— Дать затвердеть и хранить при 4 °С.

В. Дрожжевой экстракт

— Добавить 250 г сухих пекарских дрожжей в 1 л дистиллированной воды и довести до кипения.
— Профильтровать через двойной слой фильтровальной бумаги ватман № 12.
— Добавить NaOH, доведя pH до 8,0, разлить во флаконы по 10 мл, автоклавировать и хранить при —20 °С.

6. Среда с соевым пептоном и диализатом дрожжей (Kenny, 1973).

А. Исходный бульон

Соевый пептон (Sheffield Chem. Co. Norwich, NY)	30 г
NaCl	5 г
H_2O	1 л

Довести pH до 7,4 и, если требуется исходный агар, добавить 10 г агара Нобль Дифко.
Автоклавировать и хранить при комнатной температуре.

Б. Дрожжевой диализат.

450 г активных сухих Флейшманновских дрожжей добавить к 1250 мл H_2O и автоклавировать в течение 5 мин при 121 °С. Диализовать раствор против 1 л воды при 4 °С в течение 2 суток; диализат автоклавировать и хранить в замороженном виде.

В. Полная среда

Исходный бульон (или агар)	65 мл
Дрожжевой диализат	10 мл
Лошадиная сыворотка	25 мл
Пенициллин	20 000 ед.
Ацетат таллия (3,3%)	1 мл

Включение в среду аргинина (16 мМ) и фенолового красного (0,4 мг%) позволяет выявлять аргининдезаминазу по образованию щелочи, дающей пурпурную окраску.

Приложение 5. Испытания

1. Определение содержания ДНК, РНК и белка.

Используя описанную ниже процедуру, можно определять содержание ДНК, РНК и белка в одном и том же препарате клеток.

а. Собрать клетки трипсинизацией и определить их количество с помощью гемоцитометра (разд. 8.2) или электронного счетчика клеток (разд. 8.2.2).
б. Дважды промыть клеточную суспензию в ФСБ для удаления внеклеточного белка и затем дважды проэкстрагировать холодной 5%-ной ТХУ для удаления кислоторастворимого материала.
в. Растворить примерно 10^7 клеток в 1 мл 0,10 н. NaOH (в случае необходимости нагреть до 40 °С).
г. 0,15 мл раствора клеток смешать с 2,85 мл 0,7 н. NaOH и использовать для определения содержания белка (см. ниже).
д. К оставшимся 0,85 мл раствора добавить 0,15 мл 3,3 н. хлорной кислоты. Инкубировать при 70 °С в течение 30 мин. Центрифугировать и определить в надосадочной фракции (высокотемпературный кислотный экстракт) содержание ДНК и РНК.

А. Определение содержания ДНК

Приготовить дифениламиновый реактив по Бартону (Burton, 1956). Для этого к 500 мл ледяной уксусной кислоты добавить 7,5 мл концентрированной серной кислоты и 7,5 г дифениламина. Тщательно перемешать и хранить в бан-

ке из темного стекла при комнатной температуре. Перед использованием к 20 мл этой смеси добавить 0,1 мл 1,6%-ного ацетальдегида.

— Аликвоты высокотемпературного кислотного экстракта разнести по 0,4 мл в пробирки и добавить 0,5 н. хлорной кислоты до объема 1 мл.
— Добавить по 2 мл дифениламинового реактива и перемешать.
— Закрыть пробками и инкубировать при 30 °С в течение 18—48 ч. Определить поглощение при 600 нм.

Стандартный раствор ДНК можно приготовить, растворив нативную ДНК в 50 мМ KCl; концентрацию ДНК можно определить по спектру поглощения (Hirschman, Felsenfeld, 1966). У ДНК тимуса теленка, растворенной до концентрации 1 мг/мл, значение E_{260} равно 18,5. Затем к стандартному раствору ДНК добавляют хлорную кислоту до концентрации 0,5 н. и раствор инкубируют при 70 °С в течение 30 мин для гидролиза ДНК. Раствор разбавляют 0,5 н. хлорной кислотой до концентрации ДНК 100 мкг/мл и различные аликвоты раствора объемом до 1,0 мл используют, как описано выше, для получения стандартной кривой.

Б. Определение содержания РНК

Стандартный раствор РНК готовят, растворив РНК в 0,05 М NaOH до концентрации 50 мкг/мл.

— Аликвоты (0,2 мл) высокотемпературного кислотного экстракта разнести по большим пробиркам (6×5/8 дюйма[1]) и добавить воды до 1,5 мл. Для построения стандартной кривой использовать объемы стандартных растворов РНК до 1,5 мл.
— В каждую пробирку добавить 1,5 мл 0,03%-ного раствора $FeCl_3$ в концентрированной HCl и 0,1 мл свежеприготовленного 20%-ного раствора орцинола в 95%-ном этаноле.
— Тщательно перемешать и инкубировать в *сильно*кипящей водяной бане в течение 30 мин. Использовать стеклянные «слёзки» для предотвращения испарения жидкости.
— Охладить в ледяной бане и определить поглощение при 665 нм.

В. Определение содержания белка

Этот метод является модификацией метода Лоури (Lowry et al., 1951). Реактив Фолина — Чиокальто может быть получен от фирмы British Drug House Ltd. (приложение 3). Перед использованием его следует довести до концентрации 2 н. Раствор А готовят в день анализа путем последовательного добавления к 100 мл 13%-ного Na_2CO_3, 3 мл 4%-ного NaK-тартрата ($NaKC_4H_4O_6 \times 4H_2O$; соль Рошеле) и 3 мл 2%-ного $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и немедленного перемешивания. В качестве стандарта используется бычий сывороточный альбумин (150 мкг/мл).

— Аликвоты (0,2 и 0,6 мл раствора клеток; см. выше 1, г) внести в пробирки и довести объем до 1,5 мл 0,66 н. NaOH.
— Добавить по 1,5 мл раствора А и перемешать.
— Спустя *точно* 10 мин добавить 0,5 мл реактива Фолина — Чиокальто с помощью пипетки на выдувание объемом 0,5 мл и *сразу после этого тщательно перемешать*.
— Инкубировать при комнатной температуре 30 мин и определить поглощение при 625 нм.

2. Флуоресцентные методы определения содержания ДНК

Чувствительность дифениламинового метода можно увеличить снижением объема реакционной смеси, но существуют флуоресцентные методы с использованием диаминобензойной кислоты (Kissane, Robins, 1958; Hinegardner, 1971)

---

[1] 1 дюйм соответствует 2,54 см. — *Прим. ред.*

или бромида этидия (Klotz, Zimm, 1972), чувствительность которых позволяет определять 0,1 мкг ДНК. В методе Хинегарднера обессоленную ДНК высушивают в силиконизированной пробирке и затем инкубируют при 60 °С в течение 45 мин с 0,1 мл переочищенной диаминобензойной кислоты (0,4 г/мл воды). Затем в пробирку добавляют 1,5 мл 1 н. HCl и измеряют флуоресценцию при 500 нм (комбинация запирающих фильтров 2А-12 и 65А) при длине волны возбуждающего света 410 нм (первичный фильтр 405). Этот метод можно применять непосредственно к клеткам. После просчета количества клеток суспензию фиксируют 10%-ным нейтральным формалином, забуференным до pH 8 с помощью 0,1 *М* бората, и клетки перед высушиванием несколько раз промывают водой. Если испытываются несколько разных объемов одной и той же суспензии, то наклон кривой (зависимость эмиссии от объема) может служить мерой концентрации ДНК.

Приложение 6

Сокращения

АКТГ	адренокортикотропный гормон
БОЕ	бляшкообразующая единица
БСИ	базальная среда Игла
ВВС	вирус везикулярного стоматита
ВГП	вирус герпеса простого
ВНБ	вирус ньюкастлской болезни
ВСР	вирус саркомы Рауса
ГАЕ	гем-агглютинирующая единица
ГФРТ	гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза
Декон	детергент
ДФО	дифенилоксазол
КМС	кальгонметасиликат
ЛКМС	лишенный кальция и магния СБСР
МВМ	мелкий вирус мышей
МИ	митотический индекс
МСИ	минимальная среда Игла
МСИ10	минимальная среда Игла с 10% сыворотки теленка
МСИП	минимальная среда Игла с сывороткой плода крупного рогатого скота
МСИТС	минимальная среда Игла с триптозофосфатом (10%) и сывороткой теленка (10%).
СБСР	сбалансированный буферный солевой раствор
СТГ	соматотропный гормон (гормон роста)
ТРИТЦ	тетраметилродаминизотиоцианат
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ФГА	фитогемагглютинин
ФИТЦ	флуоресцеинизотиоцианат
ФРФ	фактор роста фибробластов
ФСБ	фосфатный солевой буфер
ХК	хлорная кислота
ЦПЭ	цитопатогенный эффект
ЭДТА	этилендиаминотетраацетат (версен)

ЭМС	этилметансульфонат
ЭРФ	эпидермальный ростовой фактор
Ad2	аденовирус 2
AMP, ADP, ATP	аденозинмоно-, аденозинди- и аденозинтрифосфат
ATCC	American Type Culture Collection (американская коллекция типовых культур)
BHK-клетки	линия клеток почки новорожденного хомячка
BUdr	бромдезоксиуридин
CHO-клетки	линия клеток яичников китайского хомячка
CMP, CDP, CTP	цитидинмоно-, цитидинди- и цитидинтрифосфат
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories (лаборатории медицинских исследований в Коннауте)
dAMP, dTMP	дезоксиаденозинмонофосфат, дезокситимидинмоиофосфат и т. д.
De Pex	среда для заключения препаратов, поставляемая фирмой G. T. Gurr Ltd. (приложение 3)
GMP, GDP, GTP	гуанозинмоно-, гуанозинди- и гуанозинтрифосфат
GS-фильтр	мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, поставляемый фирмой Millipore Corp.
HAT-среда	культуральная среда с добавкой гипоксантина, амииоптерина и тимидина
Hep-клетки	линия эпителиальных клеток человека
HTC-клетки	линия культивируемых клеток гепатомы
Methocel	карбоксиметилцеллюлоза типа MC (4000 сПз), поставляемая фирмой Dow Chemical Co.
MNNG	N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидин
MOPC	линия клеток плазмацитомы, индуцированной минеральным маслом
MSE	фирма, поставляющая медицинское и научиое оборудование (Medical and Scientific Equipment Ltd.)
NCTC	National Cancer Tissue Culture (коллекция клеточных культур Национального института раковых исследований, США)
PPLO	микоплазма, плевропневмониеподобный организм
PyY-клетки	линия клеток BHK, трансформированных вирусом полиомы
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (научно-исследовательский институт в США)
S-фаза	фаза синтеза ДНК в клеточном цикле
SV40	обезьяний вирус 40
T-антиген	трансплантационный антиген
*t*G1, *t*G2, *t*S и *t*M	продолжительность фаз клеточного цикла G1, G2, S и M соответствеино
ts-мутант	температурочувствительный мутант
UMP, UDP, UTP	урндинмоно-, уридинди- и уридинтрифосфат
7X	детергент

Литература

Aaronson S. A., Todaro G. I. (1968). Science, **162**, 1024.
Abercrombie M., Heaysman J. E. M. (1954). Exp. Cell Res., **6**, 293.
Abercrombie M., Ambrose E. J. (1962). Cancer Res., **22**, 525.
Abo-Darus J. M. (1977). Ph. D. Thesis, University of Glasgow.
Abo-Darub J. M., Mackie R., Pitts J. D. (1978). Bull. Cancer, **63**, 357.
Adams R. L. P., Abrams R., Lieberman I. (1966). J. Biol. Chem., **241**, 903.
Adams R. L. P., Lindsay J. G. (1967). J. Biol. Chem., **242**, 1314.
Adams R. L. P. (1968). FEBS Lett., **2**, 91.
Adams R. L. P. (1969a). Exp. Cell Res., **56**, 49.
Adams R. L. P. (1969b). Exp. Cell Res., **56**, 55.
Adams R. L. P., Berryman S., Thomson R. (1971). Biochim. Biophys. Acta, **240**, 455.
Aherne W. A., Camplejohn R. S., Wright N. A. (1977). Cell Population Kinetics (E. Arnold).
Alexander S. S., Colonna G., Yamada K. M., Pastan I., Edelhoch H. (1978). J. Biol. Chem., **253**, 5820.
Alt F. W., Kellems R. E., Schimke R. T. (1976). J. Biol. Chem., **251**, 3063.
Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T. (1978). J. Biol. Chem., **253**, 1357.
Antoniades H. N., Scher C. D. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 1973.
Aposhian N. V., Kornberg A. (1962). J. Biol. Chem., **237**, 519.
Armstrong D. (1966). Proc. Soc. Exp. Bol. Med., **122**, 475.
Armstrong D. (1973). In: Contamination in Tissue Culture, Fogh J. (ed.), Academic Press, New York, p . 51.
Arrighi F. E., Hsu T. C. (1965). Exp. Cell Res., **39**, 305.
Aub J .C., Tieslau C., Lankester A. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **50**, 613.
Augusti-Tocco G., Sato G. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **64**, 311.
Baker J. B., Simmer R. L., Glenn K. C., Cunningham D. D. (1979). Nature, **278**, 743.
Ballard P. L., Tomkins G. M. (1969). Nature, **224**, 344.
Baltimore D., Smoler D. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 1507.
Barnstable C. J., Bodmer W. F., Brown G., Galfre G., Milstein C., Williams A. F., Ziegler A. (1978). Cell, **14**, 9.
Baron S., Isaacs A. (1962). Brit. Med. J., **1**, 18.
Baron S. (1969). In: Fundamental Techiques in Virology, Habel K. and Satzman N. P. (eds.), Academic Press, New York, p. 399.
Baserga R. (1961). J. Hist. Cyt., **9**, 586.
Baserga R., Malamud D. (1969). Autoradiography: Techniques and Applications, Harper, New York, p. 54.
Baserga R. (1978). J. Cell Physiol., **95**, 377.
Basilico C. (1977). Adv. Cancer Res., Klein G. and Weinhous S. (eds.), Academic Press, New York, vol. 24, p. 223.
Basilico C. (1978). J. Cell Physiol., **95**, 367.
Basilico C., Zouzias D. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 1931.
Baumunk C. N., Friedman D. L. (1971). Cancer Res., **31**, 1930.
Bello L. J. (1974). Exp. Cell Res., **89**, 263.
Benda P. J., Lightbody G. H., Sato L., Levine L., Sweet H. (1968). Science, **161**, 370.
Bennett M. V. L. (1973). Fed. Proc., **32**, 65.
Bernstine E. G., Hooper M. L., Grandchamp S., Ephrussi B. (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 3899.
Biswas D. K., Lyons J., Tashjian A. H. (1977). Cell, **11**, 431.
Bjursell G., Reichard P. (1973). J. Biol. Chem., **218**, 3904.
Black P. H., Crawford E. M., Crawford L. U. (1964). Virology, **24**, 381.

Blakley R. L. (1969). In: The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, Frontiers of Biology, vol.13, Neuberger A. and Tatum E. L. (eds.), North Holland Publ. Co., Amsterdam.
Bolen J. B., Smith G. L. (1977). J. Cell Physiol., **91**, 441.
Boone C. W., Harell G. S., Bond H. E. (1968). J. Cell Biol., **36**, 369.
Bootsma D., Budke L., Vos O. (1964). Exp. Cell Res., **33**, 301.
Borsa J., Whitmore C. F. (1969). Mol. Pharmacol., **5**, 318.
Bostock C. J., Prescott D. M., Kirkpatrick J. B. (1971). Exp. Cell Res., **68**, 163.
Bourgeois S., Newby R. F. (1977). Cell, **11**, 423.
Boyum A. (1968). Scand. J. Clin. Invest., **21** (Suppl. 97), 31.
Bradbury S. (1976). The Optical Microscope in Biology, Edward Arnold, London.
Brent J. P., Butler J. A. V., Crathorn A. R. (1965). Nature, **207**, 176.
Brent J. P. (1971). Cell Tissue Kinet., **4**, 297.
Brooks R. F. (1975). J. Cell Physiol., **86**, 369.
Brooks R. F. (1976). Nature, **260**, 248.
Brown N. C., Reichard P. (1969). J. Mol. Biol., **46**, 39.
Buckingham M. E. (1977). In: Biochemistry of Cell Differentiation, vol. II, Paul J. (ed.), University Park Press, Baltimore, p. 269.
Buonassisi V., Sato G., Cohen A. I. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **48**, 1184.
Burger M. M. (1970). Nature, **227**, 170.
Burk R. R. (1970). Exp. Cell Res., **63**, 309.
Burk R. R. (1976). Exp. Cell Res., **101**, 293.
Burskirk H. H. (1967). Appl. Microbiol., **15**, 1442.
Burton K. (1956). Biochem. J., **62**, 315.
Cairns J. (1966). J. Mol. Biol., **15**, 372.
Cairns J. (1972). Harvey Lects, **66**, 1.
Calissano P., Monaco G., Castellani L., Mercanti D., Levi A. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 2210.
Callan H. G. (1972). Proc. Roy. Soc. Lond., R **181**, 19.
Caro L. (1966). Progr. Biophys., **16**, 171.
Carpenter G., King L., Cohen S. (1978). Nature, **276**, 409.
Caskey C. T., Kruh G. D. (1979). Cell, **16**, 1.
Caspersson T., Zech L., Johnsson C., Modest E. J. (1970a). Chromosoma, **30**, 215.
Caspersson T., Huthen M., Lindsten J., Zech L. (1970b). Exp. Cell Res., **63**, 240.
Caspersson T., Lomak K. G., Zech L. (1971). Hereditas, **67**, 89.
Clausen J. (1969). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work T. S. and Work E. (eds.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 423.
Cleaver J. E. (1965). Exp. Cell Res., **39**, 697.
Cleaver J. E., Holford R. M. (1965). Biochim. Biophys. Acta, **103**, 654.
Cleaver J. E. (1967). Thymidine Metabolism and Cell Kinetics, North Holland Publ. Co., Amsterdam.
Cleaver J. E. (1969a). Nature, **218**, 652.
Cleaver J. E. (1969b). Radiat Res., **37**, 334.
Comings D. E., Avelino E., Okada T. A., Wyandt H. E. (1973). Exp. Cell Res., **77**, 469.
Cooper J. E. K. (1973). In: Tissue Culture: Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press, New York, p. 266.
Cooper R. A., Perry S., Breitman T. R. (1966). Cancer Res., **20**, 2265.
Cory T. G., Mansell M. M., Whitford T. W. (1976). Adv. Enz. Regulat., **14**, 45.
Creagan R. P., Ruddle F. H. (1977). In: Molecular Structure of Human Chromosomes, Yunis J. J. (ed.), Academic Press, New York, p. 89.
Creasey W. A., Markiw M. C. (1965). Biochim. Biophys. Acta, **103**, 635.
Cress A. E., Gerner E. W. (1977). Exp. Cell Res., **110**, 347.

Croce C. M., Sawicki W., Kritchevsky D., Koprowski H. (1971). Exp. Cell Res., 67, 427.
Cruickshank C. N. D., Cooper J. R., Conran M. B. (1959). Exp. Cell Res., **16**, 695.
Dain A. R., Hall J. G. (1967). Vox Sang, **13**, 281.
Dalton C. C., Street H. E. (1976). In vitro, **12**, 485.
Das M., Fox C. F. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 2544.
Davidson R. L., O'Malley K. A., Wheeler T. B. (1976). Somatic Cell Genet., 2, 271.
Dawson K. B., Field E. O., Stevens G. W. (1962). Nature, **195**, 210.
Dean P., Jett J. (1974). J. Cell Biol., **60**, 523.
Defendi V., Manson L. A. (1963). Nature, **198**, 359.
Deibel R., Hotchin J. (1961). Virology, **14**, 66.
Dolfini S. (1971). In: Invertebrate Tissue Culture, vol. 1, Vago C. (ed.), Academic Press, New York, p. 247.
Dolfini S., Courgeon A. M., Tiepolo L. (1970). Experientia, **26**, 1020.
Doniach I., Pelc S. R. (1950). Br. J. Radiol., **23**, 184.
Dulbecco R. (1969). Science, **166**, 962.
Dulbecco R. (1970). Nature, **227**, 802.
Dulbecco R., Freeman G. (1969). Virology, **8**, 396.
Dulbecco R., Elkington J. (1973). Nature, **246**, 197.
Eagle H. (1955a). Science, **122**, 501.
Eagle H. (1955b). J. Biol. Chem., **214**, 839.
Eagle H. (1959). Science, **130**, 432.
Eagle H. (1971). Science, **174**, 500.
Eagle H., Piez K. A., Oyama V. I. (1961). J. Biol. Chem., **236**, 1425.
Eagle H., Piez K. A. (1962). J. Exp. Med., **116**, 29.
Earle W. R. (1943). J. Nat. Cancer Inst., **3**, 555.
Earle W. R., Bryant J. C., Shilling E. L. (1954). Ann. N. Y. Acad. Sci., **58**, 1000.
Echalier G., Ohanessian A. (1969). Compt. Rend. Acad. Sci., **268**, 1771.
Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C. (1949). Science, **109**, 85.
Enger M. D., Tobey R. A., Saponara A. G. (1968). J. Cell Biol., **36**, 583.
Enger M. D., Tobey R. A. (1972). Biochemistry, **11**, 269.
Engleberg J. (1961). Exp. Cell Res., **23**, 218.
Esko J. D., Raetz C. R. H. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 1190.
Evans M. J. (1972). J. Embryol. Exp. Morphol., **28**, 163.
Evans V. J., Bryant J. C., Kerr H. A., Shilling E. L. (1964). Exp. Cell Res., **36**, 439.
Everhart L. F. (1972). Exp. Cell Res., **74**, 311.
Fenner F., McAusland B. R., Mims C. A., Sambrook J., White D. O. (1974). The Biology of Animal Viruses, Academic Press Inc., New York.
Finbow M. E., Pitts J. D. (1979). Manuscript in preparation.
Firket H. (1965). In: Cells and Tissues in Culture, vol. 1, Willmer E. V. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 201.
Firket H., Mahieu P. (1966). Exp. Cell Res., **45**, 11.
Fisher H. W., Puck T. T., Sato G. (1958). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **44**, 4.
Fiszman M. Y., Fuchs P. (1975). Nature, **254**, 429.
Fitzgerald P. J., Ord M. G., Stocken L. A. (1961). Nature, **189**, 55.
Fogh J., Hacker C. (1960). Exp. Cell Res., **21**, 242.
Fogh J., Fogh H. (1968). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **117**, 899.
Fogh J. (1973). Contamination in Tissue Culture, Academic Press Inc., New York.
Folkman J., Moscona A. (1978). Nature, **273**, 345.
Forsdyke D. R. (1968). Biochem. J., **107**, 197.
Fraenkel-Conrat H. (1974). Comprehensive Virology 1, Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R. (eds.), Elsevier Publ., Amsterdam, p. 3.
Freshney R. I. (1975). In: Laboratory Manual of Cell Biology, Hall D. and Hawkins S. (eds.), English Universities Press, London, p. 245.

Freshney R. I. (1979). In: Brain Tumours: Scientific Basis, Clinical Investigation and Current Therapy, Thomas D. G. T. and Graham D. I. (eds.), Butterworths.
Fridland R. (1974). Cancer Res., **34**, 1883.
Fridland A., Brent J. P. (1975). Eur. J. Biochem., **57**, 379.
Friend C., Patuleia M. C., de Harven E. (1966). Nat. Cancer Inst. Monogr., **22**, 505.
Friend C., Scher W., Holland J. G., Sato T. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 378.
Fulwyler M. J. (1965). Science, **150**, 910.
Furlong N. B., Novak W. B., Stubblefield J. E. (1973). Cell Tissue Kinet., **6**, 303.
Gambari R., Terada M., Bank A., Rifkind R. A., Marks P. A. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 3801.
Gardner R. S. (1969). J. Cell Biol., **42**, 320.
Gelbard A. S., Kim J. H., Perez A. G. (1969). Biochim. Biophys. Acta, **182**, 564.
Gelfant S. (1959). Exp. Cell Res., **16**, 527.
Gelfant S. (1963). Intern. Rev. Cytol., **14**, 1.
Gentry G. A., Morse P. A., Ives D. H., Gebert R., van Potter R. (1965). Cancer Res., **25**, 509.
Gey G. O. (1955). Harvey Lects, **50**, 154.
Gilbert C. W., Muldal S., Lajtha L. G. (1965). Nature, **208**, 159.
Giles R. E., Ruddle F. H. (1973). In: Tissue Culture: Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press, New York, p. 475.
Gill G. et al. (1978). Cold Spring Harbor Meeting on Cell Proliferation, in pree.
Girard M., Monteuil S., Fiszman M., Marx M., Danglot G. (1975). In: Tumor Virus — Host Cell Interaction, Kolber A. (ed.), Plenum Press, New York, p. 69.
Glenn K. C., Cunningham D. D. (1979). Nature, **278**, 711.
Godber G. (1975). Report of the Working Party on the Laboratory Use of Dangerous Pathogens, H. M. Stationery Office, Cmnd. 6054.
Goss S. J., Harris H. (1975). Nature, **255**, 680.
Grace T. D. C. (1962). Nature, **195**, 788.
Grace T. C. D. (1966). Nature, **211**, 366.
Gray P. (1972). The use of the Microscope, McGraw Hill, New York.
Green M. (1970). Ann. Rev. Biochem., **39**, 701.
Green H., Meuth M. (1974). Cell, **3**, 127.
Green H. (1977). Cell, **11**, 405.
Green H. (1978). Cell, **15**, 801.
Gresser I. (1961). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **108**, 799.
Guner M., Freshney R. I., Morgan D., Freshney M. G., Thomas D. G. T., Graham D. I. (1977). Br. J. Cancer, **35**, 439.
Gwatkin R. B. L. (1973). In: Tissue Culture: Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press, New York, p. 3.
Habel K., Salzman N. P. (1969). Fundamental Techniques in Virology, Academic Press Inc., New York.
Haigler H., Ash J. F., Singer S. J., Cohen S. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 3317.
Hakala M. T., Ishihara T. (1962). Cancer Res., **22**, 987.
Hakala M. T., Holland J. F., Horoszewicz H. S. (1963). Biochem. Biophys. Res. Comm., **11**, 466.
Hall D., Hawkins S. Laboratory Manual of Cell Biology, The English Universities Press Ltd., London.
Ham R. G. (1963). Exp. Cell Res., **29**, 515.
Ham R. G. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **53**, 288.
Ham R. G., Puck T. T. (1967). Methods in Enzymology, vol. V, Colowick S. P. and Kaplan N. O. (eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 90.
Ham R. G., McKeehan W. L. (1978). In vitro, **14**, 11.

Hand R., Ensminger W. D., Tamm I. (1971). Virology, **44**, 527.
Hand R., Tamm I. (1974). In: Cell Cycle Controls, Padilla G. M., Cameron I. L. and Zimmerman A. (eds.), Academic Press, New York, p. 273.
Harada F., Sawyer R. C., Dahlberg J. E. (1975). J. Biol. Chem., **250**, 3487.
Harris H., Watkins J. F. (1965). Nature, **205**, 640.
Harris H. (1970). Cell Fusion, Clarendon Press, Oxford.
Harris M. (1964). Cell Culture and Somatic Variation, Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.
Harrison P. R. (1976). Nature, **262**, 353.
Harrison P. R. (1977). In: Biochemistry and Cell Differentiation, vol. II, Paul J. (ed.), University Park Press, Baltimore, p. 227.
Harrison P. R., Rutherford T., Conkie D., Affara N., Sommerville J., Hissey P., Paul J. (1978). Cell, **14**, 61.
Hatchand C. G., Parker C. A. (1956). Proc. Roy Soc. London (A), **235**, 518.
Hayashi I., Sato G. H. (1976). Nature, **259**, 132.
Hayashi I., Larner J., Sato G. (1978). In vitro, **14**, 23.
Hayflick L., Moorhead P. S. (1961). Exp. Cell Res., **25**, 585.
Hayflick L. (1965a). Exp. Cell Res., **37**, 614.
Hayflick L. (1965b). Tex. Rep. Biol. Med., **23**, Suppl. 1, 285.
Healy G. M., Parker R. C. (1966a). J. Cell Biol., **30**, 531.
Healy G. M., Parker R. C. (1966b). J. Cell Biol., **30**, 539.
Heller R. (1953). Ann. Sci. Nat. (Bot. Biol.) Veg., Paris, **14**, 1.
Hellman A., Orman M. N., Pollack R. (1973). Biohazards in Biological Research, Cold Spring Harbor Labs.
Hellström I. (1967). In: J. Cancer, **2**, 65.
Hellström I., Hellström K. E. (1971). In vitro Methods in Cell Mediated Immunity, Bloom B. B. and Glade P. R. (eds.), Academic Press, New York, p. 409.
Hellström U., Hammarström S., Dillner M.-L. (1976). Scand. J. Immunol., **5**, Suppl. 5, 45.
Henle G. Henle W. (1969). J. Bacteriol., **91**, 1248.
Herzenberg L. A., Sweet L. G., Herzenberg L. A. (1976). Scient. Am., **234** (3), 108.
Hilfer S. R. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 16.
Hinegardner R. T. (1971). Anal. Biochem., **39**, 197.
Hirschberg H., Skare H., Thorsby E. (1977). J. Immunol. Meth., **16**, 131.
Hirschman S. Z., Felsenfeld G. (1966). J. Mol. Biol., **16**, 347.
Hirt B. (1967). J. Mol. Biol., **26**, 365.
Hogan B. L. M. (1977). In: Biochemistry of Cell Differentiation, vol. II, Paul J. (ed.), University Park Press, Baltimore, p. 333.
Holley R. W., Kiernan J. A. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **60**, 300.
Holley R. W. (1975). Nature, **258**, 487.
Holtzer H., Biehl J., Yeoh G., Meganatha R., Kaji A. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 4051.
Horibata K., Harris A. W. (1970). Exp. Cell Res., **60**, 61.
Horikawa M., Fox A. S. (1964). Science, **145**, 1437.
Hosaka Y., Koshi Y. (1968). Virology, **34**, 419.
House W., Waddell A. (1967). J. Pathol. Bacteriol., **93**, 125.
House W. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 338.
Howard A., Pelc S. R. (1953). Heredity (Suppl.), **6**, 261.
Hozumi V., Tonegawa S. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3628.
Hsu T. C., Kellogg D. S. (1960). J. Nat. Canc. Inst., **25**, 221.
Hsu T. C. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 764.
Huberman J. A., Riggs A. D. (1968). J. Mol. Biol., **32**, 327 (1968).
Hudson S., Upholt W. B., Devinney J., Vinograd J. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **62**, 813.

Hunter D., Bomford R. R. (1968). Hutchison's Clinical Methods, Bailliere Tindall and Cassell, Ltd., London, p. 124.
Hynes R. O., Bye J. M. (1974). Cell, **3**, 113.
Illmensee K., Stevens L. C. (1979). Scient. Am., **240**, 87.
Ives D. H., Morse P. A., van Potter A. (1963). J. Biol. Chem., **238**, 1467.
Iwakata S., Grace J. T. (1964). N. Y. J. Med., **18**, 2279.
Iyer V. N., Szybalski W. (1964). Science, **145**, 55.
Johnson S. W., Orlando M. D. (1967). Appl. Microbiol., **15**, 209.
Kajiwara K., Mueller G. C. (1964). Biochim. Biophys. Acta, **91**, 486.
Kao F. T., Puck T. T. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **60**, 1275.
Kaplan A. S. (1969). In: Fundamental Techniques in Virology, Habel K. and Salzman N. P. (eds.), Academic Press, New York, p. 487.
Keay L., Weiss S. A., Cirulis N., Wildi B. S. (1972). In vitro, **8**, 19.
Keir H. M., Hay J., Morrison J. M., Subak-Sharpe J. (1966). Nature, **210**, 369.
Kenny G. E., Pollock M. E. (1963). J. Infect. Dis., **112**, 7.
Kenny G. E. (1973). In: Contamination in Tissue Culture, Fogh J. (ed.), Academic Press, New York, p. 107.
Kerr I. M., Brown R. E., Ball L. A. (1974). Nature, **250**, 57.
Kishimoto S., Lieberman I. (1964). Exp. Cell Res., **36**, 92.
Kissane J. M., Robins E. (1958). J. Biol. Chem., **233**, 184.
Klebe R. J. (1974). Nature, **250**, 248.
Klevecz R. R. (1969). Science, **166**, 1536.
Klevecz R. R., Kapp L. N., Remington J. A. (1974). In: Control of Proliferation of Animal Cells, Clarkson B. and Baserga R. (eds.), Cold Spring Harbor Press, p. 817.
Klevecz R. R. (1975). Methods in Cell Biol., **10**, Prescott D. M. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 157.
Klevecz R. R., Keniston B. A., Deaven L. L. (1975). Cell, **5**, 195.
Klotz L. C., Zimm B. H. (1972). J. Mol. Biol., **72**, 779.
Knazek R. A., Gullino P. M. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 321.
Knazek R. A., Kohler P. O., Gullino P. M. (1974). Exp. Cell Res., **84**, 251.
Kniazeff A. J. (1973). In: Contamination in Tissue Culture, Fogh J. (ed.), Academic Press, New York, p. 233.
Kohler G., Milstein C. (1975). Nature, **256**, 495.
Kohler G., Milstein C. (1976). Eur. J. Immunol., **6**, 511.
Kowalski J., Cheevers W. P. (1976). J. Mol. Biol.,**104**, 603.
Kraemer P. M., Deaven L. L., Crissman H. A., Steinkamp J. A., Peterson D. F. (1973). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 133.
Krakoff I. H., Brown N. C., Reichard P. (1968). Cancer Res., **28**, 1559.
Kubitschek H. E. (1966). Nature, **209**, 1039.
Kuchler R. J. (1977). Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowdon, Hutchinson and Ross, Stroudsburgh, Pa.
Kummer D., Kaml F., Heitland W., Jacob E. (1978). Z. Krebsforsch, **91**, 23.
Lark K. G., Consigli R., Tolivar A. (1971). J. Mol. Biol., **58**, 873.
Lavappa K. S. (1978). In vitro, **14**, 469.
Lazarides E., Revel J. P. (1979). Scient. Am., **240** (5), 88.
Leake R. E. (1978). Personal communication.
Lee M. J., Vaughan M. H., Abrams R. (1970). J. Biol. Chem., **245**, 4525.
Leffert H. L., Moran R., Boorstein R., Koch K. S. (1977). Nature, **267**, 58.
Lennartz K. J., Maurer W. (1964). Z. Zellforsch, **63**, 478.
Lett J. T., Sun C. (1970). Radiat. Res., **44**, 771.
Ley K. D., Tobey R. A. (1970). J. Cell Biol., **47**, 453.
Lieberman I., Ove P. (1957). Biochim. Biophys. Acta, **25**, 449.
Lieberman L., Ove P. (1962). J. Biol. Chem., **237**, 1634.
Lieberman L., Abrams R., Hunt N., Ove P. (1963). J. Biol. Chem., **238**, 3955.
Lightbody J., Pfeiffer S. E., Kornblitt P. L., Herschman H. R. (1970). J. Neurobiol., **1**, 411.

Lin C. C., Uchida I. A., Byrnes E. (1971). Can J. Genet. Cytol., **13**, 361.
Lindsay J. G. (1969). Ph. D. Thesis, Glasgow University.
Lindsay J. G., Berryman S., Adams R. L. P. (1970). Biochem. J., **119**, 839.
Linsley P. S., Blifeld C., Wrann M., Fox C. F. (1979). Nature, **278**, 745.
Lipkin M. (1971). In: Cell Cycle and Cancer, Baserga R. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 1.
Lippman M., Monaco M. E., Bolan G. (1977). Cancer Res., 37, 1901.
Liskay R. M., Prescott D. M. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 2873.
Littlefield J. W. (1964). Science, **145**, 709.
Littlefield J. W. (1966a). Biochim. Biophys. Acta, **114**, 398.
Littlefield J. W. (1966b). Exp. Cell Res., **41**, 190.
Littlefield J. W., Basilico C. (1966). Nature, **211**, 250.
Littlefield J. W. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **62**, 88.
Littlefield J. W., Goldstein S. (1970). In vitro, **6**, 21.
Lockart R. Z., Eagle H. (1959). Science, **129**, 252.
Loomis W. F., Wahrmann J. P., Luzzati D. (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 425.
Lovelock J. E., Bishop M. W. H. (1959). Nature, **183**, 1394.
Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). J. Biol. Chem., **193**, 265.
Macdonald H. R., Miller R. G. (1970). Biophys. J., **10**, 834 (1970).
Macieira-Coelho A., Ponten J., Philipson L. (1966). Exp. Cell Res., **43**, 20.
Macpherson I. (1973a). In: Tissus Culture, Methode and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.). Academic Press Inc., New York, p. 241.
Macpherson I. (1973b). Ibid, p. 246.
Macpherson I. A., Stoker M. (1962). Virology, **16**, 147.
Macpherson I. A., Montagnier L. (1964). Virology, **23**, 291.
Marchi A., Rai K. S. (1978). Can. J. Genet. Cytol., **20**, 243.
Marks P. A., Rifkind R. A. (1978). Ann. Rev. Biochem., **47**, 419.
Marschall R. (1972). Chromosoma, **37**, 395.
Martin G. M. (1973). In: Tissue Gulture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 39.
Martin G. R., Evans M. J. (1975a). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 1441.
Martin G. R., Evans M. J. (1975b). Cell, **6**, 467.
Massie H. R. (1972). In vitro, **7**, 191.
Matsuya Y., Green H. (1969). Science, **163**, 697.
Maturo J. M., Hollenberg M. D. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 3070.
Mauel J., Defendi V. (1971a). Exp. Cell Res., **65**, 33.
Mauel J., Defendi V. (1971b). J. Exp. Med., **134**, 335.
Mayhew E. (1972). J. Cell Physiol., **79**, 441.
McBurney M. W., Whitmore G. F. (1975). Cancer Res., **35**, 586.
McCoy T. A., Maxwell M., Kruse P. F. (1959). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **100**, 115.
Melnick J. L. (1955). Ann. N. Y. Acad. Sci., **61**, 754.
Merigan T. C., Gregory D. F., Petralli J. K. (1966). Virology, **29**, 515.
Miller C. L., Ruddle F. H. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 3346.
Miller O. L., Stone G. E., Prescott D. M. (1964a). J. Cell Biol., **23**, 654.
Miller O. L., Stone G. E., Prescott D. M. (1964b). Methods in Cell Physiol., **1**, Prescott D. M. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 371.
Miller R. G., Phillips R. A. (1969). J. Cell Physiol., **73**, 191.
Miller Z., Lovelace E., Gallo M., Pastan I. (1975). Science, **190**, 1213.
Minor P. D., Smith J. A. (1974), Nature, **248**, 241.
Minty A. J.., Birnie G. D., Paul J. (1978). Exp. Cell Res., **115**, 1.
Mintz B., Illmensee K. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 3585.
Mitchison J. M. (1971). The Biology of the Cell, Cambridge University Press.
Mitsuhashi J., Maramorosch K. (1964). Contrib. Boyce Thomson Inst., **22**, 435.
Moenz W.. Vokaer A., Kram R. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1063.
Moore E. C., Hurlbert R. B. (1966). J. Biol. Chem., **241**, 4802.

Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M., Humgerford D. A. (1960). Exp. Cell Res., **20**, 613.
Morgan J. M., Morton H. J., Parker R. C. (1950). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **73**, 1.
Morgan J. A., Campbell M. E., Morton H. J. (1955). J. Nat. Cancer Inst., **16**, 557.
Morris N. R., Fischer G. A. (1960). Biochim. Biophys. Acta, **42**, 183.
Morris N. R., Cramer J. W., Reno D. (1967). Exp. Cell Res., **48**, 216.
Morton H. J. (1970). In vitro, **6**, 89.
Mudd S. H., Cantoni G. L. (1964). In: Comprehensive Biochemistry, 15, Florkin M. and Stotz E. G. (eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 1.
Mueller G. C., Kajiwara J. (1966). Biochim. Biophys. Acta, **119**, 557.
Mueller G. C. (1971). In: The Cell Cycle and Cancer, Baserga R. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 269.
Mukherjee A. B., Orloff S., de Butler J., Triche T., Lalley P.. Schulman J. B. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 1361.
Murashige T., Skoog F. (1962). Physiol. Plant, **15**, 473.
Murphree S., Stubblefield E., Moore E. C. (1969). Exp. Cell Res., **58**, 118.
Nadal-Grinard B. (1978). Cell, **15**, 855.
Nairn R. C. (ed.) (1969). Fluorescent Protein Tracing, Livingstone, Edinburgh, p. 61.
Neff J. M., Enders J. F. (1968). Proc. Exp. Biol. Med., **127**, 260.
Nelson D. S. (1976). Immunobiology of the Macrophage, Academic Press, New York.
Nishimoto T., Eilen E., Basilico C. (1978). Cell, **15**, 475.
Nitsch J. P., Nitsch C. (1956). Am. J. Bot., **43**, 839.
Odell W. D., Rayford P. L., Ross G. T. (1967). J. Lab. Clin. Med., **70**, 973.
Ogburg C. A., Berg K., Paucker K. (1973). J. Immunol., **111**, 1206.
Ogle J. W., Lange R. D., Dunn C. D. R. (1978). In Vitro, **14**, 945.
Okada S. (1967). J. Cell Biol., **34**, **915**.
Olden K. et al. (1979). Br. Soc. Cell Biol. Symp., in press.
Oldham K. G. (1967). J. Labelled Comp., IV, 127.
Orkin S. H. (1978). In vitro, **14**, **146**.
Papioannou V. E., McBurney M. W., Gardner R. L., Evans M. J. (1975). Nature, **258**, 70.
Pardee A. B. (1974). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 1286.
Parker R. C. (1957). Special Publ. of N. Y. Acad. Sci., **5**, 303.
Parker R. C. (1959). Can. Cancer Conf., **3**, 189.
Patil S., Merrick S., Lutz H. A. (1971). Science, **173**, 821.
Patterson M. K., Maxwell M. D. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York.
Patulria M. C., Friend C. (1967). Cancer Res., **27**, 726.
Paul J. (1975). Cell and Tissue Culture, 5th ed., E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh.
Pearlstein E. (1976). Nature, **262**, 487.
Pearse A. G. E. (1953). Histochemistry, Churchill, London.
Pegararo L., Benzio G. (1971). Experientia, **27**, 33.
Pertoft H., Laurent T. C., Laas T., Kagedal L. (1978). Anal. Biochem., **88**, 271.
Petersen D. F., Anderson E. C., Tobey R. A. (1968). In: Methods in Cell Physiology, vol. 3, Prescott D. M. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 347.
Peterson D. M., Moore E. C. (1976). Biochim. Biophys. Acta, **432**, 80.
Pfeiffer S. E., Tolmach L. J. (1967). Nature, **213**, 139.
Pfeiffer S. E., Wechsler W. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 2885.
Pharmacia (1978). Cytodex™1 — Beaded Microcarriers for Cell Culture, Pharmacia Fine Chemicals A. B. Uppsala.
Pitts J. D. (1971). Ciba Foundation Symposium on Growth Control. In: Cell Cultures, Wolstenholme G. E. W. and Knight J. (eds.), Churchill Livingstone, London, p. 89.

Pitts J. D., Finbow M. E. (1977). In: Intercellular Communication, De Mello W. C. (ed.), Plenum Press. New York, p. 61.
Pitts J. D., Simms J. W. (1977). Exp. Cell Res., **104**, 153.
Pollock M. E., Kenny G. E. (1963). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **112**, 176.
Pontecorvo G., Riddle P. N., Hales A. (1977). Nature, **265**, 257.
Ponter J. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 50.
Potter M. (1972). Physiol. Rev., **52**, 631.
Potter M. (1975). In: Cancer — a Comprehensive Treatise 1, Becker F. F. (ed.), Plenum Press, New York.
Potter M. (1976). In: Methods in Cancer Res. II, Busch H. (ed.), Academic Press, New York, p. 105.
Prop F. J. A., Wiepjes G. J. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press, Press Inc., New York, p. 21.
Puck T. T. (1964). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **29**, 167.
Puck T. T., Marcus P. I., Cieciura S. J. (1956). J. Exp. Med., **103**, 273.
Puck T. T., Steffen J. (1963). Biophys. J., **3**, 379.
Puck T. T., Saunders P., Petersen D. (1964). Biophys. J., **4**, 441.
Puck T. T. (1972). The Mammalian Cell as a Microorganism, Holden Day Inc., San Francisco.
Puri E. C., Turner D. C. (1978). Exp. Cell Res., **115**, 159.
Rabbitts T. H., Milstein C. (1977). Cont. Top. Mol. Immunol., **6**, 117.
Rabinowitz Y. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 25.
Rabinowitz Y. (1964). Blood, **23**, 811.
Raff M. C., Abney E., Brookes J. P., Hornby-Smith A. (1978). Cell, **15**, 813.
Reichard P., Canellakis Z. N., Canellakis E. S. (1961). J. Biol. Chem., **236**, 2514.
Reinert J., Bajaj Y. P. S., Zbell B. (1977). In: Plant Tissue and Cell Culture, 2nd ed., Street H. E. (ed.), Blackwell, Oxford, p. 389.
Revel M., Groner Y. (1978). Ann. Rev. Biochem., **47**, 1079.
Rheinwald J. G., Green H. (1975). Cell, **6**, 331
Rheinwald J. G., Green H. (1977). Nature, **265**, 421.
Ricciuti F. C., Ruddle F. H. (1973). Nature New Biol., **241**, 180.
Richman R. A., Claus T. H., Pilk B. S. J., Friedman D. L. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3589.
Richter C., Yaffe D. (1970). Develop. Biol., **23**, 1.
Ringertz N. R., Savage R. E. (1976). Cell Hybrids, Academic Press Inc., New York.
Robbins E., Marcus P. I. (1964). Science, **144**, 1152.
Robbins E., Scharff M. D. (1967). J. Cell Biol., **34**, 684.
Rodwell A. (1969). In: The Mycoplasmatales and L-phase of Bacteria, Hayflick L. (ed.), Appleton, New York, p. 413.
Ronaldoni L. M. J. (1959). Exp. Cell Res., **16**, 477.
Roos D., Loos J. A. (1970). Biochim. Biophys. Acta, **222**, 565.
Rosenthal M. D., Wishnow R. M., Sato G. H. (1970). J. Nat. Cancer Inst., **44**, 1001.
Ross R., Vogel A. (1978). Cell, **14**, 203.
Rossini M., Baserga R. (1978). Biochemistry, **17**, 858.
Ruddle F. H. (1973). Nature, **242**, 165.
Rudland P. S. (1978). Nature, **276**, 113.
Rudland P. S., Gospodarowitz D., Seifert W. (1974). Nature, **250**, 741.
Ruekert R. R., Mueller G. C. (1960). Cancer Res., **20**, 1584.
Russel W. C., Newman C., Williamson D. H. (1975). Nature, **253**, 461.
Rutherford R. B., Ross R. (1976). J. Cell Biol., **69**, 196.
Rutter W. J., Pictet R. L., Worris P. W. (1973). Ann. Rev. Biochem., **42**, 601.
Saborio J. L., Pong S. S., Koch G. (1974). J. Mol. Biol., **85**, 195.

Sahyoun N., Hock R. A., Hollenberg M. D. (1978). Proc. Nat Acad. Sci. USA, 75, 1675.
Samborn R. C., Haskell J. A. (1961). Proc. Int. Cangr. Entomol., **83**, 237.
Sanford B. H., Codington J. F., Jeanloz R. W., Palmer P. D. (1973). J. Immunol., **110**, 1233.
Sanford K. K. (1973). In: Tissue Culture — Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 237.
Sanford K. K., Earle W. R., Likely G. D. (1948). J. Nat. Canc. Inst., **9**, 229.
Sanford K. K., Earle W. R., Evans V. J., Waltz H. K., Shannon J. E. (1951). J. Nat. Cancer Inst., **11**, 773.
Sanford K. K., Covalesky A. B., Dupree L. T., Earle W. R. (1961). Exp. Cell Res., **23**, 361.
Sato G. (1973). Tissue Culture of the Nervous System, Plenum Press, New York.
Satto H., Miura K.-I. (1963). Biochim. Biophys. Acta, **72**, 619.
Sauerborn R., Balmain A., Gaerttler K., Stohr M. (1978). Cell Tissue Kinet, **11**, 291.
Scher W., Tsuel D., Sassa S., Price P., Gabelman N., Friend C. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 3851.
Schimke R. T., Kautman R. J., Nunberg J. H., Dana S. L. (1978). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **43**, 1297.
Schindler R., Odastchenko N., Grieder A., Ramseier L. (1968). Exp. Cell Res., **51**, 1.
Schleicher J. B. (1973). In: Tissue Culture: Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 333.
Schlessinger J., Schechter Y., Willinghan M. C., Pastan I. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 2659.
Schubert D., Harris A. J., Heinemann S., Kidokoro Y., Patrick J., Steinbach J. H. (1973). Tissue Culture of the Nervous System, Sato G. (ed.), Plenum Press, New York, p. 55.
Seabright M. (1971). Lancet, **2**, 971.
Seegmiller J. E., Rosenbloom F. M., Kelley W. M. (1967). Science, **155**, 1682.
Schechter Y., Hernaez L., Cuatrecasas P. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 5788.
Shall S., McClelland A. J. (1971). Nature New Biol., **279**, 59.
Shall S. (1973a). In: Tissue Culture — Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 195.
Shall S. (1973b). Ibid, p. 198.
Sheinin R. (1976). Cell, **7**, 49.
Shields R., Brooks R. F., Riddle P. N., Capellaro D. F., Delia D. (1978). Cell, **15**, 469.
Siegers M. P., Schaer J. C., Hirsiger H., Schindler R. (1974). J. Cell Biol., **62**, 305.
Sinclair R., Bishop D. H. L. (1965). Nature, **305**, 1272.
Sinclair W. K. (1965). Science, **150**, 1729.
Singh K. R. P. (1967). Current Sci., **36**, 506.
Sisken J. E., Morasca L. (1965). J. Cell Biol., **25** (2, part 2), 179.
Skea B. R., Nemeth A. M. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **64**, 795.
Skoog K. L., Nordenskjold B. A., Bjursell K. G. (1973). Eur. J. Biochem., **33**, 428.
Skoog K. L., Bjursell G. (1974). J. Biol. Chem., **249**, 6434.
Smith C. L., Dendy P. P. (1962). Nature, **193**, 555.
Smith J. A., Martin L. (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 1263.
Smith J. A., Martin L. (1974). In: Cell Cycle Controls, Padilla G. M., Cameron I. L. and Zimmerman A. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 43.
Smith H. S., Scher C. D., Todaro G. J. (1970). Bacteriol. Proc. Abstr., **217**, 187.
Smith P. F. (1971). The Biology of Mycoplasmas, Academic Press, New York.
Somers D. G., Pearson M. L., Ingles C. J. (1975). J. Biol. Chem., **250**, 4825.

Spendlove R. S., Crosbie R. B., Hayes S. F., Keller R. F. (1971). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **137**, 258.
Stadler J. K., Adelberg E. A. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 1929.
Stanbridge E. J., Hayflick L., Perkins F. T. (1971). Nature New Biol., **232**, 242.
Steffensen D. M. (1977). In: Molecular Structure of Human Chromosome, Yunis J. J. (ed.), Academic Press, New York, p. 59.
Sternberger L. A., Hardy P. H., Coculis J. J., Meyer H. G. (1970). J. Histochem. Cytochem., **18**, 315.
Stimac E., Houseman D., Huberman J. A. (1977). J. Mol. Biol., **115**, 485.
Stock D. A., Gentry G. A. (1971). J. Gen. Microbiol., **65**, 105.
Stoker M. G. P., Macpherson I. A. (1961). Virology, **14**, 359.
Stoker M. G. P., Macpherson I. A. (1964). Nature, **203**, 1355.
Stoker M. G. P. (1968). Nature, **218**, 234.
Stoker M. G. P. (1972). Proc. Roy. Soc., B **181**, 1.
Stoker M. G. P. (1973). Nature, **246**, 200.
Street H. E. (1975a). In: Laboratory Manual of Cell Biology, Hall D. and Hawkins S. (eds.), English Universities Press, London, p. 222.
Street H. E. (1975b). Ibid, p. 225.
Street H. E. (1977). Plant Tissue and Cell Culture, 2nd ed., Blackwell, Oxford.
Strickland S., Beers W. H. (1976). J. Biol. Chem., **251**, 5694.
Strickland S., Reich E., Sherman M. I. (1976). Embryol. Exp. Morphol., **18**, 155.
Strickland S., Mahdavi V. (1978). Cell, **15**, 393.
Stubblefield E. (1964). In: Cytogenetic of Cells or Culture, Harris R. J. C. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 223.
Stubblefield E. (1973). Int. Rev. Cytol., **35**, 1.
Stubblefield E., Mueller G. C. (1962). Cancer Res., **22**, 1091.
Stubblefield E., Mueller G. C. (1965). Biochem. Biophys. Res. Comm., **20**, 535.
Stubblefield E., Klevecz R., Deaven L. (1967). J. Cell Physiol., **69**, 345.
Stubblefield E., Dennis C. M. (1976). J. Theoret. Biol., **61**, 171.
Studzinski G. P., Lambert W. C. (1969). J. Cell Physiol., **73**, 109.
Talavera A., Basilico C. (1977). J. Cell Physiol., **92**, 425.
Taylor C. R. (1978). Arch. Pathol. Lab. Med., **102**, 113.
Taylor E. W. (1965). J. Cell Biol., **25** (1, part 2), 145.
Taylor J. M., Stanners C. P. (1967). Biochim. Biophys. Acta, **138**, 627.
Tegtmeyer P. (1972). J. Virol., **10**, 599.
Temin H. M. (1970). J. Cell Physiol., **78**, 161.
Terasima T., Tolmach L. J. (1961). Nature, **190**, 1210.
Terasima T., Tolmach L. J. (1963). Exp. Cell Res., **30**, 344.
Thompson E. B., Tomkins G. M., Curran J. F. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **56**, 296.
Thompson L. H., Mankovitz R., Baker R. M., Till J. E., Siminovitch L., Whitmore G. F. (1970). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **66**, 377.
Thompson L. H., Baker R. M. (1973). In: Methods in Cell Biology, vol. 6, Prescott D. M. (ed.), Academic Press, Inc., New York, p. 210.
Tobey R. A. (1973). Methods in Cell Biology, vol. 6, Prescott D. M. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 67.
Tobey R. A., Petersen D. F., Anderson E. C., Puck T. T. (1966). Biophys. J., **6**, 567.
Tobey R. A., Ley K. D. (1970). J. Cell Biol., **46**, 151.
Tobey R. A., Ley K. D. (1971). Cancer Res., 31, 46.
Tobey R. A., Petersen D. F., Anderson E. P. (1971). In: The Cell Cycle and Cancer, Baserga R. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 309.
Todaro G. J., Green H. (1963). J. Cell Biol., **17**, 299.
Todaro G. J., Lazar G. K., Green H. (1965). J. Cell Comp. Physiol., **66**, 325.
Tolmach L. J., Marcus P. I. (1960). Exp. Cell Res, **20**, 350.
Tooze J. (1973). Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Labs.
Tormey D. C., Mueller G. C. (1965). Blood, **26**, 569.

Turnbull J. F., Adams R. L. P. (1975). Nucl. Acids Res., **3**, 677.
Turner M. K., Abrams R., Lieberman I. (1966). J. Biol. Chem., **241**, 5777.
Turner M. K., Abrams R., Lieberman I. (1968). J. Biol. Chem., **243**, 3725.
Vago C. (1971). Invertebrate Tissue Culture, vols. I and II, Academic Press Inc., New York.
Van Dilla M. A., Fulwyler M. J., Boone I. U. (1967). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **125**, 367.
Van Dilla M. A., Trujillo T. T., Mullaney P. F., Coulter J. R. (1969). Science, **163**, 1213.
Van Wezel A. L. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 372.
Vaughan J. L. (1971). In: Invertebrate Tissue Culture, vol. 1, Vago C. (ed.), Academic Press Inc., New York, p. 3.
Vigier P. (1970). 2nd Int. Symp. Tumour Viruses, 1969, p. 205.
Vogel A., Raines E., Kariya B., Rivest M.-J., Ross R. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 2810.
Walters R. A., Tobey R. A., Ratliffe R. L. (1973). Biochim. Biophys. Acta, **319**, 336.
Walther B., Rausch B., Roseman S. (1976). J. Cell Biol., **70**, 70a.
Wang H. C., Federoff S. (1972). Nature New Biol., **235**, 52.
Wang H. C., Fedoroff S. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 782.
Warmsley A. M. H., Pasternak C. A. (1970). Biochem. J., **119**, 493.
Wasley G. D., May J. W. (1970). Animal Cell Culture Methods, Blackwell, Oxford.
Watkins J. F. (1971). Methods of Virology, vol. 5, Maramorosch K. and Koprowski H. (eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 1.
Weigert M., Gatmaitan L., Loh E., Shilling J., Hood L. (1978). Nature, **276**, 785.
Weintraub H. (1976). Cell, **9**, 419.
Weiss M. C., Green H. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **58**, 1104.
Westall F. C., Lennon V. A., Gospodarowicz D. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 4675.
Westermark B., Wasteson A. (1976). Exp. Cell Res., **98**, 170.
Whitaker A. M. (1972). Tissue and Cell Culture, Bailliere Tindall, London.
White M., Eason R. (1973). Nature New Biol., **241**, 46.
Whitmore G. F., Gulyas S. (1966). Science, **151**, 691.
Wiblin C. N., Macpherson I. A. (1972). Int. J. Cancer, **10**, 296.
Wigzell H. (1965). Transplantation, **3**, 423.
Wildy P. (1971). Monogr. Virol., **5**, 1.
Willecke K., Lange R., Krüger A., Reber T. (1976a). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 1274.
Willecke K., Davies P. J., Reber T. (1976b). Cytogen. and Cell Gen., **16**, 405.
Williams A. F., Galfre G., Milstein C. (1977). Cell, **12**, 663.
Williamson J. D., Cox P. (1968). J. Gen. Virol., **2**, 309.
Willmer E. N. (1965). Cells and Tissues in Culture, vols 1, 2 and 3, Academic Press Inc., New York.
Wittes R. E., Kidwell W. R. (1973). J. Mol. Biol., **78**, 473.
Wyatt G. R., Kal G. F. (1957). J. Gen. Physiol., **40**, 833.
Xeros N. (1962). Nature, **194**, 682.
Yaffe D. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **61**, 477.
Yaffe D. (1973). In: Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse P. F. and Patterson M. K. (eds.), Academic Press Inc., New York, p. 106.
Yamada K. M., Olden K. (1978). Nature, **275**, 179.
Yamane I., Matsuya Y., Jimbo K. (1968). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **127**, 335.
Yunker C. E., Vaughn J. L., Cory J. (1976). Science, **155**, 1565.
Zain B. S. (1971). Ph. D. Thesis, University of Glasgow.
Zain B. S., Adams R. L. P., Imrie R. C. (1973). Cancer Res., **33**, **40**.

Предметный указатель

Автоклавирование *см.* Стерилизация
Авторадиография *см.* Радиоавтография
Агар, наслаивание 206
— кровяной 57, 111, 239
— PPLO 117, 239
Агароза, гель-электрофорез 204
Адгезия 25. См. также Прикрепление клеток к субстрату
Акридиновый оранжевый 235
Акрихин 104
Аметоптерин 157, 185—186
Аминокислоты заменимые *Игла* 225
Аминоптерин 157, 161, 185—186
Ампулы *Брауна* 48
Антибиотики 81, 224
Антисыворотка 208—209
Антитела 12, 208
Асептическая техника 112
Ацетоореин 235

Белок, определение скорости синтеза 173
— — содержания 241
Бикарбонат натрия 75, 223
Биопсии 65
Бокс ламинарный 114
Бромдезоксиуридин 28, 183
Бульон триптозофосфатный 74, 111, 225
— с экстрактом сердца 238
— — — — и мозга 111, 238

Ваномицин 81
Версен *см.* ЭДТА
Винбластин 124, 125
Винкристин 124, 125
Вирус герпеса простого 199, 205
— *Сендай*, инактивация 203
— — при гибридизации *см.* Слияние клеток
— — получение 202
— энцефаломиокардита 199
— SV40 197, 200, 201
Вирусы, классификация 196, 198
— обнаружение 203
— получение 199
— предосторожности при работе с ними 197
— характерные ферменты 204

Гемагглютинация 211
Гематоксилин 236
Гибридизация клеток *см.* Слияние клеток
Гидроксимочевина 160
Гидролизат лактальбумина 81, 225
Гимза, окраска 105, 235
Гимза — Мэй-Грюнвальд, окраска 236
Глюкоза 75, 224
Гормоны 12, 84
Грам, окраска 235

Детергенты 45
Диализат дрожжевой 240
Дигидрофолятредуктаза 158, 184, 185
Диметилсульфоксид 28, 100, 215
Дифференцировка клеток *см.* Культура клеток
ДНК, определение количества 240, 241
— — синтеза 163
— репарация 181

Желатин 23

Загрязнение культуры бактериальное 109—112, 238
— — вирусное 121
— — из воздуха 112
— — микоплазмой 115—121, 239
Загрязненный материал, удаление 115
Замораживание клеток 99—102

Интерферон 14

Каллюс 16—17
Кальгон-метасиликат 45
Карнуа фиксатор 235
Клетки гигантские 23
— форма 25
Клеточный цикл 123, 146
— — анализ 133—142
— — — графический метод 138
— — — проточной микрофлуорометрией 140
— — — функция накопления 136
— — влияние облучения 143
— — — ядов 142
— — контроль 22, 127
— — моделирование на ЭВМ 144
— — распределение клеток по нему 130
— — состояние А 128
— — фаза G0, G1, G2 22, 123, 142, 144

— — фаза S 124, 142
— — — — блокирование 156
— — фаза В
Клонирование клеток 88
— — в капиллярах 88, 91
— — — многолуночных подносах 91
— — на фидерном слое 92
— — под агаром 91
Коллаген 23
Коллагеназа 53
Колхицин 124, 125
Колцемид 124, 125, 136, 147
Контакт межклеточный щелевой 25, 194
Контактное торможение *см.* Регуляция, зависящая от плотности клеток
Культура клеток, газовый обмен 30
— — глии 10
— — дифференцировка 10, 27, 214
— — на покровных стеклах 32, 89, 90
— — опухоли молочной железы 13
— — плазмоцитомы 11
— — получение реплик 188—189
— — преимущества 8
— — применение 10—16
— нервных клеток 10
— первичная клеток двукрылых 72
— растительной ткани 16
— — — куриных эмбрионов 70
— — — мышиных эмбрионов 69
— — — печени куриных эмбрионов 71
— — кожи человека 65
— — лимфоцитов 60
— — макрофагов 68
— — мышц крыс и цыплят 68
— — почек

Лейшман, окраска 236
Лектины 26
Лизолецитин 193

Мембраны клеток 25
Метиленовый синий 236
N-Метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) 183
Метилцеллюлоза
Метотрексат *см.* Аметоптерин
Микоплазма 115
— влияние на клетки 116
— культивирование 116
— обнаружение 118
— удаление 120
Микроносители 40

Микроскопия интерференционная 108
— фазово-контрастная 107
— флуоресцентная 108
Мутагены 183
Мутанты клеток ауксотрофные 183
— — отбор 184
— — температурочувствительные 187

Облучение 46, 112, 182
Объем клеток 95—96
Орсеин, окраска 236

Перколл в разделении клеток 62
Подложки капиллярные 38
Подсчет клеток в гемоцитометре 93
— — — электронном счетчике 94
Полиэтиленгликоль 193
Прикрепление клеток к субстрату 23
Пролиферативный пул 132
Проназа 53
Пропиолактон 203

Радиоавтография 118, 126, 174, 182, 195
— в чашках 177
— микоплазмы 118
— отделяемые пленки 175
— растворимых компонентов 179—181
— фон 179
— эмульсии 174
Разделение клеток избирательной адсорбцией 64
— — проточной микрофлуорометрией
— — седиментацией
Регуляция, зависящая от плотности клеток 24
— — — прикрепления 23
— — — сыворотки 84
РНК, определение синтеза 173
— — содержания 241

Слияние клеток вирусом *Сендай* 191
— — лизолецитином 193
— — полиэтиленгликолем 193
Солевой раствор сбалансированный (СБСР) 75
— — *Дюльбекко* 77, 223
— — *Игла* 75
— — *Хэнкса* 75, 222
— — *Эрла* 75, 222
Среда для культивирования клеток насекомых 86

Среда *Игла* 78, 226
— — базальная 78, 226
— — минимальная 78, 226
— — — модифицированная 226, 227, 229
— — сухая 79, 228
— кондиционированная 21, 88
— концентрированная 78, 227, 228
— *Мак-Коя см.* Среда RPMI
— *Мельника* 81
— *Сабората* 53, 111, 239
— селективная HAT 190
— с соевым пептоном и диализатом дрожжей 240
— *Хэма* 80, 89, 230
— 74, 199, 231
— CMRL 81, 234
— NCTC 8, 233
— RPMI-1629 80, 230
Стерилизация автоклавированием 47, 109
— горячим воздухом 46
— облучением 46, 109
— фильтрованием 48, 110
Сыворотка, влияние на клетки 21, 82, 84
— диализованная 83
— обработка сефадексом 84

Тест на бляшки 204
Трансформация клеток 18—20, 212
Трипсин 52

Фактор, получаемый из тромбоцитов 85
Фактор роста фибробластов 85, 86
— — эпидермальный 85, 216
Феноловый красный 225
Фиколл в разделении клеток 62
Фиксация клеток 179, 235
Флуорохром 108
— бис-бензамидный (*Хехст* 33258) 119
— бромид этидия 140, 242
— 4,6-диамидино-2-фенилиндол 119
Формол, фиксатор 235
Фтордезоксиуридин 159, 187
Функция накопления 136

Хлорос 44
Хранение клеток 98
Хромат 16
Хромосомы, кариотипирование 102
— радиоавтография 126
— сегментация Q и G 105

Центрифугирование градиентное 62, 150, 204
Цитодекс 42
Цитозинарабинозид 187
Цитотоксичность, методы определения

ЭДТА 54
Экстракт дрожжевой 239
— куриных эмбрионов 228
Эмульсия антипенная 34
Эозин 236
PPLO *см.* Микоплазма

Оглавление

Предисловие редактора перевода 5

Благодарности 6

Глава 1. Введение 7

1.1. Основы 7
1.2. Некоторые преимущества 8
1.3. Применения 10
1.3.1. Дифференцировка 10
1.3.2. Генетика 11
1.3.3. Иммунология 12
1.3.4. Гормоны 12
1.3.5. Образование клеточных продуктов 13
1.3.6. Вирусология и трансформация клеток 14
1.3.7. Определение цитотоксичности 15
1.4. Культура растительной ткани 16

Глава 2. Характерные особенности культивируемых клеток . . . 18

2.1. Первичные клетки и трансформация 18
2.2. Потребности в питательных веществах 20
2.3. Контроль роста 22
2.3.1. Клеточный цикл и цикл роста 22
2.3.2. Зависимость от прикрепления и рост в суспензии . . 23
2.3.3. Регуляция, зависящая от плотности культуры (контактное торможение) 24
2.3.4. Клеточная мембрана 25
2.4. Дифференцировочные функции в культуре клеток 27
2.5. Фирмы-поставщики и транспортирование 28

Глава 3. Посуда, используемая при культивировании 30

3.1. Выбор посуды 30
3.1.1. Газовый обмен 30
3.1.2. Закупоренные сосуды 30
3.1.3. Техника перфузии 31
3.2. Монослойные культуры 32
3.2.1. Мелкомасштабные культуры 32
3.2.2. Культуры промежуточного масштаба 34
3.2.3. Крупномасштабные культуры 34
3.3. Суспензионные культуры 39
3.4. Микроносители 40

Глава 4. Подготовка посуды и техника стерилизации 44

4.1. Общие замечания 44
4.1.1. Процедура мытья 45
4.1.2. Бутыли и пипетки 45
4.1.3. Резиновые пробки 46
4.1.4. Моечные машины 46
4.2. Методы стерилизации 46
4.2.1. Горячий воздух 46
4.2.2. Автоклавирование 47
4.2.3. Контроль стерилизации 48
4.2.4. Фильтрование 48

Глава 5. Пересев 52

5.1. Техника диссоциации 52
5.1.1. Трипсин 52
5.1.2. Проназа 53
5.1.3. Коллагеназа 53
5.1.4. Версен (ЭДТА) 54
5.1.5. Механические методы 55
5.2. Пересев клеточного монослоя 56
5.2.1. Подсчет живых клеток 56
5.2.2. Проверка на бактериальное заражение 57
5.3. Цикл роста 57

Глава 6. Первичные клетки 60

6.1. Введение 60
6.2. Лимфоциты 60
6.2.1. Выделение лейкоцитов и аутологичной плазмы . . . 60
6.2.2. Очистка лимфоцитов 61
6.2.3. Метод очистки на колонке со стеклянными бусами . . 61
6.2.4. Метод градиентного центрифугирования 62
6.2.5. Культивируемые лимфоциты 63
6.2.6. Разделение Т- и В-лимфоцитов 64
6.3. Биопсия кожи человека 65
6.4. Первичные клетки почки 66
6.5. Культуры мышиных макрофагов 68
6.6. Клетки скелетных мышц крысы или цыпленка 68
6.7. Культуры клеток мышиного эмбриона 69
6.8. Клетки куриного эмбриона 70
6.9. Клетки печени куриных эмбриоиов 71
6.10. Культура клеток двукрылых 72

Глава 7. Среды для культуры клеток 74

7.1. Введение 74
7.2. Сбалансированные солевые растворы 75
7.2.1. Цвиттерионные буферы 77
7.3. Среда Игла 78
7.3.1. Сухие среды 79
7.4. Более усложненные среды 80
7.5. Простые среды с неидентифицированными добавками . . . 81
7.6. Антибиотнки 81
7.7. Сыворотка 82
7.7.1. Удаление из сыворотки маленьких молекул . . . 82

7.7.2. Роль сыворотки 84
7.8. Другие природные добавки 86
7.9. Среды для культивирования клеток насекомых 86

Глава 8. Методы 88

8.1. Клонирование клеток и эффективность посева 88
8.1.1. Простые методы клонирования или определения эффективности посева 89
8.1.2. Капиллярный метод 91
8.1.3. Клонирование под агаром 91
8.1.4. Клонирование на фидерном слое 92
8.2. Методы счета клеток 93
8.2.1. Гемоцитометр 93
8.2.2. Электронный счетчик клеток 94
8.2.3. Сравнение методов 97
8.3. Хранение клеток 98
8.3.1. Процедура замораживания 99
8.3.2. Размораживание клеток после хранения в жидком азоте 101
8.3.3. Организация стоков замороженных клеток 101
8.4. Кариотипирование 102
8.4.1. Приготовление хромосом для анализа 102
8.4.2. Кариотипирование 103
8.4.3. Q-сегментация 105
8.4.4. G-сегментация 105
8.5. Визуализация клеток 106
8.5.1. Фазово-контрастная микроскопия 107
8.5.2. Флуоресцентная микроскопия 108

Глава 9. Бактериальные загрязнения 109

9.1. Бактериальные загрязнения 109
9.1.1. Стеклянная и пластиковая посуда 109
9.1.2. Клетки 109
9.1.3. Среда 109
9.2. Проверка стерильности 110
9.3. Анализ бактериальных загрязнений 111
9.4. Загрязнения из воздуха 112
9.4.1. Асептическая техника 112
9.4.2. Системы с ламинарным током воздуха 114
9.5. Антибиотики 114
9.6. Удаление загрязненного материала 115
9.7. Микоплазмы 115
9.7.1. Влияние на культуры клеток 116
9.7.2. Культуры микоплазм 116
9.8. Окрашивание микоплазмы 118
9.8.1. Окрашивание орсеином 118
9.8.2. Радиоавтография 118
9.8.3. Флуоресцентное окрашивание 119
9.9. Удаление микоплазмы 120
9.10. Вирусное загрязнение 121

Глава 10. Клеточный цикл 123

10.1. Описание 123
10.2. Митоз 123
10.3. Фаза S 124
10.4. Контроль клеточного цикла 127

10.5. Распределение клеток по циклу 130
10.6. Пролиферативный пул 132
10.7. Анализ клеточного цикла 133
10.7.1. Метод импульсного включения тритированного тимидина 133
10.7.2. Метод непрерывного мечения 134
10.7.3. Функции накопления 136
10.7.4. Графический анализ 138
10.7.5. Проточная микрофлуориметрия 140
10.8. Яды, облучение и клеточный цикл 142
10.8.1. Фаза S 142
10.8.2. Фаза G2 142
10.8.3. Фаза G1 144
10.9. Тимидинкиназа и моделирование клеточного цикла на ЭВМ 144

Глава 11. Синхронизация клеток 146

11.1. Введение 146
11.2. Отбор митотических клеток 146
11.2.1. Встряхивание 147
11.2.2. Трипсинизация 148
11.3. Избирательная гибель клеток в одной из фаз клеточного цикла 148
11.4. Отбор клеток по размеру 149
11.4.1. Отбор клеток в электронном счетчике 149
11.4.2. Зональное центрифугирование 150
11.5. Синхроннзация пересевом 152
11.6. Недостаточное содержание сыворотки 154
11.7. Голодание по изолейцину 155
11.8. Блокирование фазы S 156
11.8.1. Действие аминоптерина и аметоптерина (метотрексата) 157
11.8.2. Действие 5-фтордезоксиуридина 159
11.8.3. Действне высоких концентраций тимидина . . . 159
11.8.4. Действне гидроксимочевины 160
11.9. Индукция синхронизации на границе фаз G1/6 160
11.9.1. Голодание по изолейцину и гидроксимочевина . . . 160
11.9.2. Клетки в стационарной фазе и аминоптерин . . . 161
11.9.3. Двойной тимидиновый блок 161
11.9.4. Сравнение методов 161
11.10. Синхронизация в фазе G2 162

Глава 12. Использование радиоактивных изотопов в клеточной культуре 163

12.1. Определение скоростей сиитеза ДНК 163
12.1.1. Решение проблемы 167
12.1.2. Применение к суспензионным культурам 172
12.2. Оценка скоростей синтеза РНК и белка 173
12.3. Радиоавтография 174
12.3.1. Эмульсии 174
12.3.2. Отделяемые пленки 175
12.3.3. Жидкая эмульсня 176
12.3.4. Радиоавтография в чашках 177
12.3.5. Значимость подсчета числа зерен 177
12.3.6. Фоновое число зерен 179
12.3.7. Радиоавтография водорастворимых компонентов . . 179
12.4. Репарация ДНК 181
12.4.1. Ультрафиолетовое облучение 182
12.4.2. Изменение репаративного синтеза 182

Глава 13. Клеточные мутанты и гибридные клетки 183

13.1. Ауксотрофные мутанты 183
13.2. Отбор мутантов 184
13.2.1. Процедура выделения TK^--мутантов 187
13.3. Температурочувствительные мутанты 187
13.4. Посев реплик животных клеток 188
13.5. Гибридизация соматических клеток 189
13.5.1. Слияние клеток с помощью вируса Сендай 191
13.5.2. Слияние клеток ВНК21/С13 с эритроцитами кур с использованием вируса Сендай 192
13.5.3. Слияние клеток с помощью лизолецитина 193
13.5.4. Слияние клеток с использованием полиэтиленгликоля 193
13.6. Межклеточные связи 194
13.6.1. Подсчет числа зерен и межклеточные связи . . . 195

Глава 14. Вирусы 196

14.1. Введение 196
14.1.1. Классификация вирусов животных 197
14.1.2. Предосторожности при работе с зараженными вирусами клетками 197
14.2. Получение вирусов 199
14.2.1. Процедура получения вируса герпеса простого, вируса псевдобешенства или вируса энцефаломиокардита 199
14.2.2. Процедура для получения вируса SV40 200
14.2.3. Одноэтапный рост SV40 201
14.2.4. Вирус Сендай — получение и инактивация 202
14.3. Обнаружение вирусов 203
14.3.1. Метод подсчета бляшек 204
14.3.2. Метод флуоресцирующих антител 208
14.3.3. Гемагглютинация 211
14.4. Трансформация клеток вирусом 212
14.4.1. Методы трансформации 212

Глава 15. Дифференцировка в культурах клеток 214

15.1. Эритроидная дифференцировка клеток Френд 214
15.1.1. Индукция синтеза глобина в клетках Френд . . . 215
15.2. Кожа и кератиноциты 215
15.3. Клетки тератокарциномы 217
15.4. Культуры миеломных клеток и образование антител . . . 219
15.5. Дифференцировка мышечных клеток 220
15.6. Дифференцировка жировых клеток 221

Глава 16. Приложения 222

Приложение 1. Составы сред 222
Приложение 2. Красители и фиксаторы 235
Приложение 3. Фирмы, поставляющие приборы и реактивы . . 236
Приложение 4. Проверка стерильности 238
Приложение 5. Испытания 240
Приложение 6. Сокращения 242

Литература 244

Предметный указатель 256